MIKROCHIMICA ACTA

HERAUSGEGEBEN VON / EDITORIAL BOARD / PUBLIÉ PAR

A. A. BENEDETTI-PICHLER - New York · G. BLIX - Uppsala
C. DUVAL - Paris · F. FEIGL - Rio de Janeiro · J. HEYROVSKÝ - Praha
P. L. KIRK - Berkeley · H. LIEB - Graz · F. A. PANETH - Mainz
F. SCHNEIDER - New York · R. STREBINGER - Wien
C. L. WILSON - Belfast · M. K. ZACHERL - Wien

MITHERAUSGEBER / ASSISTANT EDITORS / RÉDACTEURS ADJOINTS

E. ABRAHAMCZIK - Ludwigshafen/Rhein · H. K. ALBER - Philadelphia
R. BELCHER - Birmingham · N. D. CHERONIS - New York
F. HECHT - Wien · W. KIRSTEN - Uppsala · A. LACOURT - Bruxelles
W. C. McCRONE - Chicago · A. L. THOMPSON - Montreal
PH. W. WEST - Baton Rouge · M. L. WILLARD - State College

SCHRIFTLEITUNG / EDITORIAL OFFICE / RÉDACTEUR EN CHEF

M. K. ZACHERL - Wien

1956

ELFTES HEFT

MIT 46 TEXTABBILDUNGEN

ABGESCHLOSSEN AM 30. AUGUST 1956

WIEN

SPRINGER-VERLAG

1956

Mikrochim. Acta

Die Zeitschrift

„Mikrochimica Acta"

erscheint zwanglos in Heften, die zu Jahresbänden von etwa 800 Seiten vereinigt werden. Der Preis eines Heftes richtet sich nach seinem Umfang und den jeweiligen Herstellungskosten.

Zur Veröffentlichung gelangen Originalarbeiten aus dem Gebiet der allgemeinen und angewandten Mikrochemie in deutscher, englischer und französischer Sprache, wenn sie nicht mehr als $1^1/_2$ Druckbogen umfassen. Die Reihenfolge der Veröffentlichung richtet sich im allgemeinen nach dem Datum des Eingangs der Manuskripte bei der Redaktion.

Für die Zeitschrift bestimmte Manuskripte aus USA. und Canada sind zu senden an:

Editors of „Mikrochimica Acta", Department of Chemistry, Queens College, Flushing, N. Y., USA. (Dr. A. A. Benedetti-Pichler and Dr. F. Schneider)

Sonstige Manuskripte in englischer Sprache sind zu senden an:

Dr. C. L. Wilson, Department of Chemistry, The Queen's University, Belfast

Manuskripte in französischer Sprache sind zu senden an:

Prof. Clément Duval, Laboratoire de Recherches micro-analytiques de l'E. N. S. C. P., 11, rue Pierre Curie, Paris, 5

Manuskripte in deutscher Sprache sind zu senden an:

Prof. Dr. M. K. Zacherl, Wien, I., Mölkerbastei 5

Geschäftliche Mitteilungen sind zu richten an:

Springer-Verlag, Wien, I., Mölkerbastei 5
Fernsprecher: U 26 5 60 Serie, Telegrammadresse: Springerbuch Wien

Grundsätzlich werden nur Arbeiten angenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite

1956 — 11. Heft

Inhaltsverzeichnis

Seite

Karrman, K. J., and **Gillis Johansson.** High Frequency Titrimetry . . 1573

Karler, A., Charlotte L. Brown, and **P. L. Kirk.** A Microtechnique for Combined Analytical or Continuous Chromatography and Electrophoresis 1585

Brown, Charlotte L., and **P. L. Kirk.** Identification of Minute Amounts of Metals and Alloys by Electrosolution and Electrophoresis 1593

Maurmeyer, R. K., E. M. Livingston, and **R. Michaels.** Slide Test for Fructose and Other Ketohexoses 1600

Mitsui, T., and **H. Sato.** Microdetermination of Halogens in Organic Compounds 1603

Kirsten, W. J. Exchange Spectrophotometry I 1617

Lacourt, A., et **P. Heyndryckx.** Ultra microméthode de dosage direct du cuivre chromatographié sur papier 1621

Derkosch, J., F. X. Mayer † und **H. Neuninger.** Spektralanalytische Untersuchungen von urzeitlichen Kupferfunden 1649

Kolšek, J. Eine Methode zur quantitativen Bestimmung der wasserunlöslichen Mutterkornalkaloide auf papierchromatographischem Wege 1662

Pietsch, R. Nitratbestimmung mit Phenarsazinsäure 1672

Department of Analytical Chemistry, University, Lund, Sweden

High Frequency Titrimetry

I. Titration of phenols and phenolic mixtures in nonaqueous media

By

K. J. Karrman and **Gillis Johansson**

With 6 Figures

(Received February 27, 1956)

Notwithstanding the fact that high frequency titrimetry* has been recognised for only a few years a great many publications have already appeared in this field, mainly by American and Japanese investigators. A large number of papers, particularly the early ones, dealt chiefly with the construction of apparatus and devoted less space to the analytical applications. The theory and general principles of HF titrimetry have been treated especially by *Reilley* and *McCurdy*[1] and *Hall, Gibson, Phillips* and *Critchfield*[2].

In HF titrimetry the beaker containing the solution to be titrated is placed in the coil or condenser in a tuned circuit. On addition of the titrating solution the composition of the solution is changed and this alteration will influence the frequency, capacitance and conductance of the circuit. If a curve is plotted showing the relation between the added amount of titrating solution and the change in one of the circuit parameters, for example the frequency, a break is found in the curve at the point of equivalence.

The HF technique is generally applicable to a variety of different titrations, such as acidimetric, argentometric, precipitation and complexing titrations. Its value is probably even greater in titration in non-aqueous media, since here the point of equivalence is often not so easily indicated by conventional methods as in aqueous solutions.

In the present investigation we have chosen to study phenols and phenolic mixtures in non-aqueous media. These compounds, which are

* High frequency will subsequently be abbreviated to HF.

often of great technical importance, are such weak acids that frequently they cannot be determined titrimetrically by existing methods. The best method, particularly in the case of phenolic mixtures, is undoubtedly by absorption measurements in the infrared region, a method, however, which presupposes a very expensive apparatus.

Ishidate and *Masui*[3] have published (in Japanese) a paper on HF titration of weak acids in non-aqueous media. This work is concerned chiefly with carboxylic acids but it is reported that phenols with strong

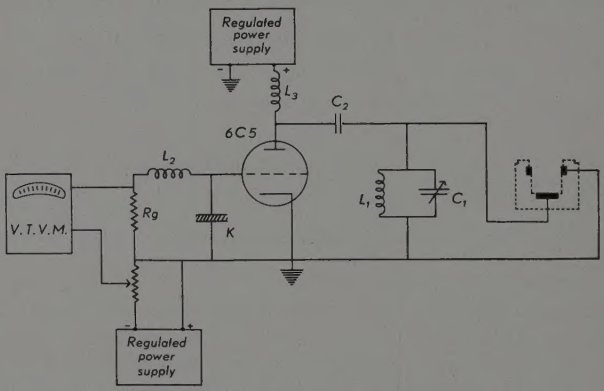

Fig. 1. Wiring Diagram of the High-Frequency Titrimeter
C_1 Variable condenser, 100 pF; C_2 Ceramic condenser, 600 pF; K Quartz Crystal, 5 Mc; L_1 40 turns wound on a ceramic cylinder, ⌀ 18 mm; L_2, L_3 Radio-frequency chokes; R_g Grid-bias resister, 40 kΩ; 6 C 5 Power radio-frequency triode; V. T. V. M. Vacuum tube voltmeter

negative groups, e. g., *o*-nitrophenol, can be titrated. On the other hand, it is said in this paper that phenol itself cannot be titrated. With the apparatus we have employed even the weakest phenols (e. g., 2-retenol) can be titrated with excellent results and, what is still better, with multivalent phenols a break in the curve is obtained for each hydroxyl group. With mixtures containing monovalent phenols a break is obtained for each component in the mixture.

Apparatus

A crystal oscillator is used, the complete circuit diagram of which is shown in Fig. 1. The power is taken from an electronically stabilized power supply. The radio-frequency is blocked by an inductor (L_3) and coupled by a condenser (C_2) to the titration cell. By this arrangement the cell will be at direct current ground potential. When the parallel circuit (L_1 C_1) is tuned to the same frequency as the crystal frequency the voltage drop across the grid resistance R_g is maximum. The change

in this voltage drop is measured by a vacuum tube voltmeter. An electronically stabilized voltage can be applied in the opposite direction to the grid bias. The variable condenser C_1 is varied until the resonant frequency is equal to the crystal frequency. When the voltmeter reading is maximum it may be assumed that the $L_1 C_1$ circuit is resonating at the crystal frequency. Changes in the reading are proportional to changes in the anode circuit loss, i. e., to the conductance changes.

The titration cell (Fig. 2) is constructed in the same manner as that employed by *Blaedel* and *Malmstadt*[4]. A bottom plate (A) and a ring (B)

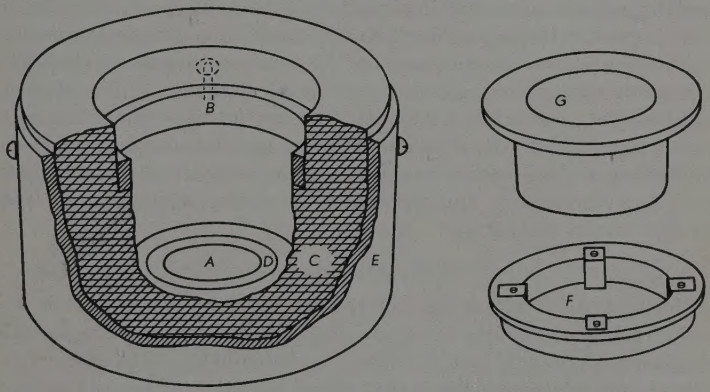

Fig. 2. Titration Cell.
The titration cell is made for a 100 ml beaker. By inserting the rings F or G, 50 or 10 ml beakers may be used

are the electrodes, both made of nickel-plated brass. The isolating material is "plexiglass" (C), with the exception of the material around the bottom plate which is made of teflon (D). The entire cell is enclosed in a brass cylinder (E), which is connected by four screws to one of the electrodes (B). This ring B has an inner diameter of 47 mm and a height of 12 mm and is intended to fit a 100-ml beaker. The distance from the center of the ring to the bottom plate is 26 mm. Ring F has an inner diameter of 39 mm and an outer one which is equal to the inner diameter of ring B. Its heights is 14 mm. F can therefore be inserted in the titration cell which in this way will fit a 50-ml beaker. The four springs, which are seen on ring F, are for fastening the beaker; this is particularly important because different beakers do not have the same diameter. Ring G has an inner diameter of 22 mm and an outer one which is equal to the inner diameter of ring F and its height is 25 mm. If the springs are removed from F, ring G can then be inserted in F and the cell will now accomodate a 10-ml beaker.

Experimental

Most of the titrations have been carried out in a 50 ml beaker, and then the volume of the solution was 30 ml. The most common solvent has been a mixture of 2 parts benzene and 1 part methanol. Some titrations were performed in benzene-dimethylformamide mixture, but this was not superior to the considerably less expensive benzene-methanol mixture.

As titration solutions 0.0230 N and 0.0362 N potassium methoxide in benzene-methanol 10 : 1 have been used. These were obtained by dissolving metallic potassium in absolute methanol. They were standardized by simple titration against benzoic acid dissolved in dimethylformamide using azo-violet as indicator, and by HF titration in benzene-methanol. Concordant values were obtained with both methods. A 5 ml burette was employed, graduated in 0.02 ml. During the titrations the burette tip was immersed in the solution. The stirring was usually carried out by bubbling carbon dioxide-free air through the solution. In the pyrocatechol, hydroquinone and pyrogallol titrations oxygen-free nitrogen was used as the stirring gas.

Analytical procedure

The beaker containing the solution to be titrated is placed in the titration cell, and sufficient negative voltage is coupled to the vacuum tube voltmeter to deflect the needle as far as possible to the right of the scale. Some of the titrating solution is then added causing a fall in the voltmeter reading. The variable condenser is now varied so that the circuit is tuned to resonant frequency. The voltmeter reading is then recorded. This procedure is repeated after each addition of titrating solution.

The majority of the titrations were carried out at 5 Mc, although a few experiments were performed at other frequencies (3.5 and 7 Mc). An increase in the frequency permits a higher concentration of phenol in the solution with unchanged sensitivity. For the microdeterminations described here, however, a frequency of 5 Mc was sufficiently high. When using a 100-ml beaker 4–8 mg of phenol are required, with a 50-ml beaker 1–4 mg, and with a 10-ml beaker 0.3–0.5 mg.

Phenols examined

The following phenols have been examined.

Monovalent: phenol, *o*-, *m*-, *p*-cresol, α- and β-naphthol, and 1-methyl-7-*iso*propyl-2-phenanthrol (2-retenol).

Divalent: pyrocatechol, resorcinol, hydroquinone.

Trivalent: phloroglucinol and pyrogallol.

The following mixtures have been analyzed: *o*- and *p*-cresol, *o*- and *m*-cresol, *o*-, *m*- and *p*-cresol, and α- and β-naphthol.

From the liquid phenols stock solutions in benzene were prepared from which suitable amounts for titration were removed by means of a pipette. The solid phenols as a rule were weighed on a microbalance, unless amounts less than 1 mg were required, when stock solutions were again employed.

Accuracy

In general the accuracy of this method was $\pm$ 1 per cent or better. The primary aim of this investigation has been to show that the phenols, which are difficult to titrate according to other methods, can be readily analyzed by means of the HF technique. The vacuum tube voltmeter, which has been at our disposal, has an accuracy of $\pm$ 2 per cent at full deflection. Furthermore we have not made any corrections for thermal changes, which especially in non-aqueous solvents may have considerable effect. With a more accurate vacuum tube voltmeter, maintenance of constant temperature and determination of even more points within the actual region of the curve the precision of the method can certainly be considerably increased.

Results

Representative results are listed in the following tables.

Table I

Titration of monovalent phenols, frequency 5 Mc

Substance	Amount of substance in mg	Solvent[3]	Amount of solvent in ml	ml of methoxide solution	
				Found	Calcd
Phenol[1]	7.90	Bz : Me 4 : 1	50	1.90	1.88
Phenol	2.26	Bz : Me 1 : 1	50	0.541	0.536
Phenol	2.26	Bz : Et 1 : 1	50	0.540	0.536
o-Cresol	1.82	Bz : Me 2 : 1	30	0.726	0.734
m-Cresol	0.948	Bz : Me 2 : 1	30	0.388	0.381
m-Cresol	3.32	Bz : Me 2 : 1	30	1.29	1.33
p-Cresol	1.355	Bz : Me 2 : 1	30	0.531	0.546
p-Cresol	0.339	Bz : Me 2 : 1	6	0.135	0.136[4]
α-Naphthol	3.26	Bz : Me 3 : 1	30	0.630	0.626
α-Naphthol	3.06	Bz : Me 2 : 1	30	0.918	0.920
β-Naphthol	2.28	Bz : Me 2 : 1	30	0.686	0.687
2-Retenol	6.40	Bz : Dmf 2 : 1	30	0.691	0.707
2-Retenol	6.40	Bz : Dmf 2 : 1	30	0.708	0.707
2-Retenol	4.59	Bz : Me 3 : 1	30	0.495	0.507
2-Retenol[2]	12.80	Bz : Me 2 : 1	30	1.38	1.399

[1] Frequency 3.5 Mc.

[2] Frequency 7 Mc.

[3] Bz = Benzene, Me = Methanol, Et = Ethanol, Dmf = Dimethylformamide.

[4] With Agla microburette.

Table II

Titration of divalent phenols. Frequency 5 Mc. Solvent Bz : Me 2 : 1, volume 30 ml

Substance	Amount of substance in mg	ml of potassium methoxide solution			
		one hydroxyl group		two hydroxyl groups	
		Found	Calcd	Found	Calcd
Pyrocatechol ...	2.52	0.652	0.633	1.260	1.266
Pyrocatechol ...	2.52	0.612	0.633	1.275	1.266
Resorcinol	2.45	0.617	0.615	1.235	1.230
Resorcinol	2.45	0.630	0.615	1.225	1.230
Hydroquinone ..	2.76	0.720	0.692	1.390	1.384

Table III

Titration of trivalent phenols. Frequency 5 Mc. Solvent Bz : Me 2 : 1, volume 30 ml

Substance	Amount of substance in mg	ml of potassium methoxide solution					
		one hydroxyl group		two hydroxyl groups		three hydroxyl groups	
		Found	Calcd	Found	Calcd	Found	Calcd
Phloroglucinol · 2 H_2O ..	2.31	0.380	0.396	0.820	0.792	1.17	1.188
Phloroglucinol · 2 H_2O ..	2.31	0.415	0.396	0.785	0.792	1.21	1.188
Pyrogallol	2.12	0.475	0.464	0.935	0.927	1.390	1.391

Table IV

Titrations of phenolic mixtures. Frequency 5 Mc. Solvent Bz : Me 2 : 1, volume 30 ml

Mixture	Amount of each component in mg	ml of methoxide solution	
		Found	Calcd
o-Cresol.....	0.912	0.35	0.366
m-Cresol	1.421	0.57	0.572
o-Cresol.....	0.912	0.37	0.366
p-Cresol	2.035	0.83	0.818
α-Naphthol	1.566	0.468	0.473
β-Naphthol	1.137	0.339	0.342
o-Cresol.....	0.912	0.38	0.366
m-Cresol	0.946	0.38	0.380
p-Cresol	0.712	0.24	0.274

Discussion of Results

Phenols substituted with halides, nitro, aldehyde, keto or ester groups are stronger acids than unsubstituted phenols and they can be titrated with good results in non-aqueous media[5]. Other phenols, particularly alkyl-substituted ones, are considerably more difficult to titrate with satisfactory accuracy. *Fritz*[6] proposes the use of *o*-nitroaniline as indicator

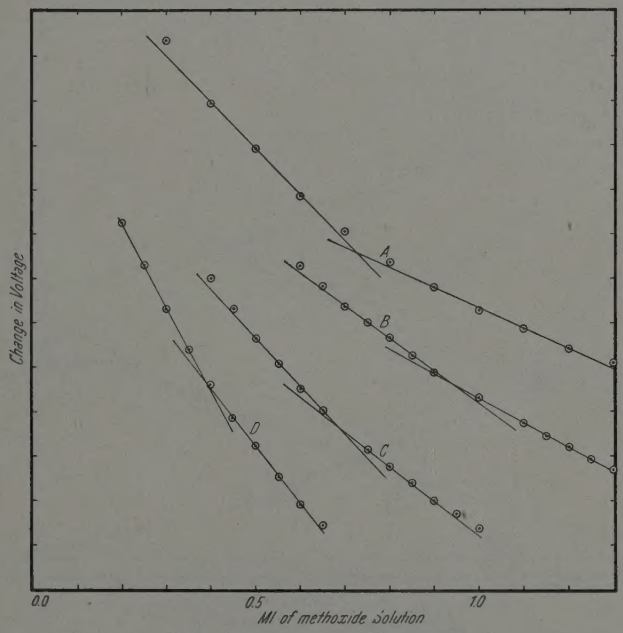

Fig. 3. Titration of Monovalent Phenols
Curve A = 2-Retenol, B = α-Naphthol, C = β-Naphthol, D = m-Cresol

in such titrations. *Takiura* and *Takino*[7] suggest *p*-nitro-*p'*-aminoazobenzene. *Lane*[8] has recently published a paper on HF titrimetry of phenols, enols and organic bases in non-aqueous media. The phenols which have been investigated in his study are, however, of unusual type, e. g., 5 : 8-dihydroxy-2 : 3-tetramethylenequinoxaline and tri-*o*-hydroxyphenylphosphine oxide.

In Table I there is a summary of the results from the titration of a number of monovalent phenols, and in Fig. 3 there are titrations curves for four compounds of this group. The ordinate represents here as in the other figures the change in the reading of the vacuum tube voltmeter

at resonant frequency. One scale division is equal to 1 volt. The abscissa represents the added amount of titration solution, 1 scale division equalling 0.1 ml. In plotting the curve (two straight lines which intersect) it is found that points at the beginning of the titration and around the point of equivalence fall outside the curve.

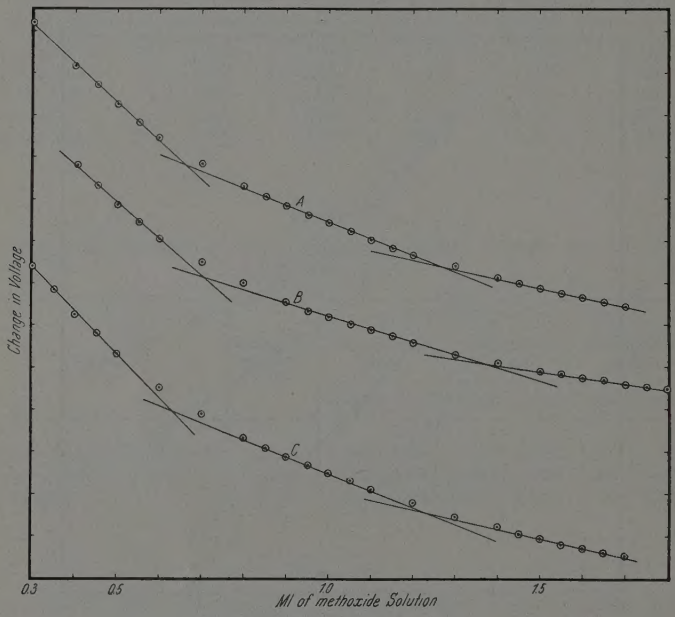

Fig. 4. Titration of Divalent Phenols
Curve A = Pyrocatechol, B = Hydroquinone, C = Resorcinol

In Table II some results from the titration of divalent phenols are collected and in Fig. 4 are shown titration curves for three representatives of this group. Here it is of great interest to observe that each hydroxyl group causes an obvious break in the curve. According to *Fritz*, pyrocatechol and resorcinol do not give any definite end points, either with an indicator or in potentiometric titration.

Trivalent phenols such as pyrogallol and phloroglucinol give rise to three breaks in the curve (see Fig. 5). From Table III it is seen that the agreement between the calculated and observed values is remarkably good. Even although the third hydroxyl group in phloroglucinol only causes a weak break, it is still distinct. *Fritz* states that phloroglucinol

can be titrated as a dibasic acid in ethylenediamine with *o*-nitroaniline as the indicator. On the whole, however, it is true of most di- or multivalent phenols that because of extreme indistinctness in determinations of the end point of equivalence they cannot be satisfactorily titrated. The stepwise titration of two or three hydroxyl groups in a molecule

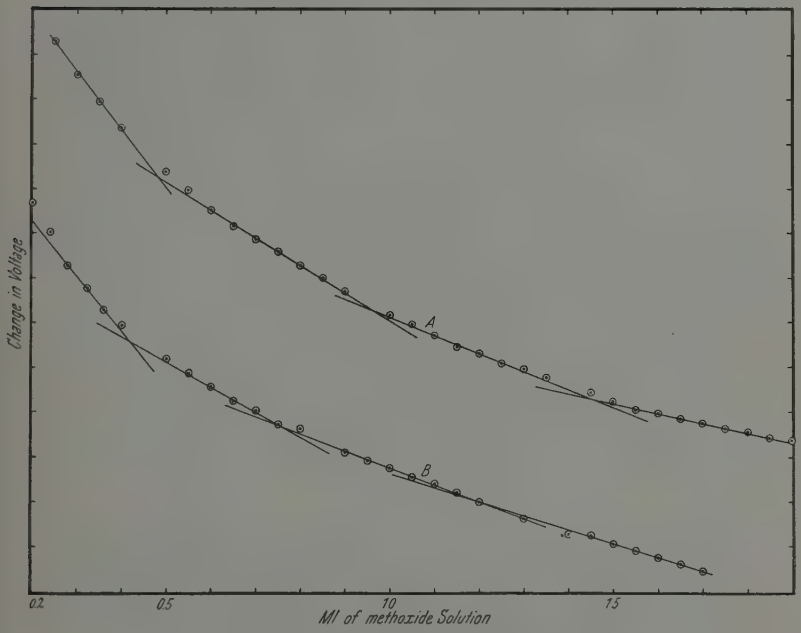

Fig. 5. Titration of Trivalent Phenols
Curve *A* = Pyrogallol, *B* = Phloroglucinol

cannot be carried out at all according to other known methods. It seems to us that in this connection particularly the HF technique is of great value; the possibility of determining the number of hydroxyl groups in a compound is always important.

Analysis of phenolic mixtures

The fact that di- and trivalent phenols give rise to a break for each hydroxyl group suggested to us that it should be possible to analyze phenolic mixtures with the HF technique. Table V gives the dissociation constants determined in water for the most common monovalent phenols. The values are from the literature. From the table it is seen that the

dissociation constants for the three cresols differ insignificantly from each other. This is also true of the two naphthols. Whether the differences are greater in benzene-methanol solution than in water is unknown to us. It is probable that the absolute values are lower; thus there is a report in the literature that α- and β-naphthol in 50 per cent ethanol have dissociation constants which are about ten times lower than those determined in water. In any case the experiments show (see Table IV) that, for example, α- and β-naphthol in a mixture can be determined with very good accuracy; mixtures of cresols also give satisfactory accuracy. It is possible to carry out an analysis of all three cresols, but, of course, here the accuracy will be poorer than in a

Table V

Dissociation constants in water for monovalent phenols

Substance	Temp. °C	Dissociation constant $\times 10^{10}$
Phenol	18	1.3
o-Cresol	25	0.63
m-Cresol	25	0.98
p-Cresol	25	0.67
α-Naphthol	20	1.40
β-Naphthol	20	1.17

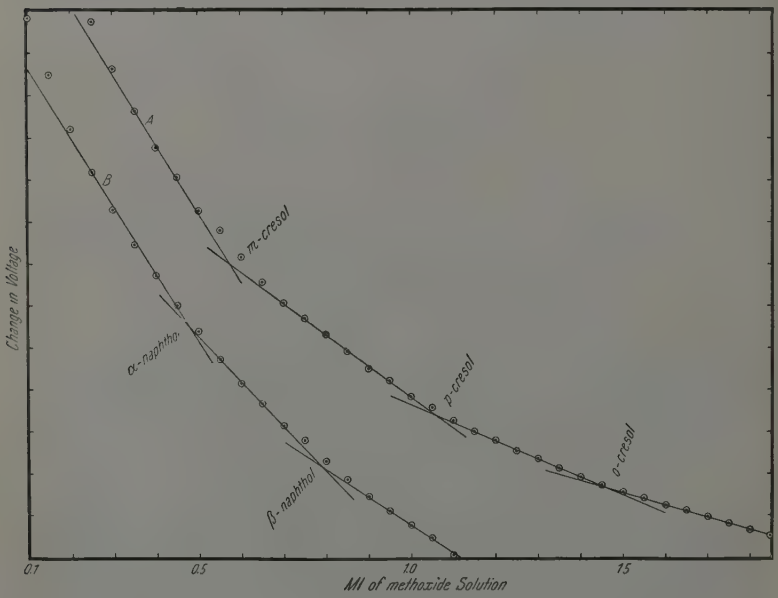

Fig. 6. Titration of Phenolic Mixtures
Curve *B* = Mixture of α- and β-Naphthol, *A* = Mixture of *o*-, *m*- and *p*-Cresol

two-component system. It is most noteworthy that in the curve for the naphthols the α-isomer comes first and then the β-isomer; in the cresol mixture the first break is caused by the *m*-isomer, the second by the *p*- and the third by the *o*-isomer.

Summary

High frequency titrations have been carried out with a crystal-controlled oscillator at 5 Mc. A measure of the change in the high frequency conductance during a titration is obtained by determining the grid bias at resonant frequency with a vacuum tube voltmeter after each addition of titrating solution.

The following monovalent phenols have been examined: phenol, *o*-, *m*- and *p*-cresol, α- and β-naphthol and 2-retenol. Of the di- and trivalent phenols we have titrated pyrocatechol, resorcinol, hydroquinone, pyrogallol and phloroglucinol. The compounds (0.5–5 mg) have generally been dissolved in benzene-methanol 2 : 1 and they have been titrated with potassium methoxide in benzene-methanol 10 : 1. Each hydroxyl group in a molecule gives rise to a break in the titration curve.

A number of mixtures of monovalent phenols have also been titrated. Each component in the mixture causes a break in the titration curve. This means that the component with the highest dissociation constant is first titrated, and then the others in order of decreasing dissociation constant.

Zusammenfassung

Hochfrequenztitrationen wurden mit Hilfe eines kristallkontrollierten Oszillators bei 5 Mc ausgeführt. Ein Maß für die Veränderung der Hochfrequenzleitfähigkeit während der Titration wurde durch Bestimmung der Gitterspannung bei eingestellter Resonanzfrequenz mittels eines Vakuumröhrenvoltmeters nach jeder Zugabe von Maßlösung erhalten.

Folgende einwertige Phenole wurden analysiert: Phenol, o-, m- und p-Kresol, α- und β-Naphthol und 2-Retenol. An zwei- und dreiwertigen Phenolen wurden titriert: Brenzcatechin, Resorcin, Hydrochinon, Pyrogallol und Phloroglucin. Die Substanzen (0,5 bis 5 mg) wurden im allgemeinen in einer Mischung von Benzol und Methanol (2 : 1) gelöst und mit Kaliummethylat in Benzol und Methanol (10 : 1) titriert. Jede Hydroxylgruppe pro Molekül führt zu einem Knick in der Titrationskurve. Ebenso wurden einige Mischungen einwertiger Phenole titriert. Jeder Mischungspartner führt zu einem Knick in der Kurve. Das bedeutet, daß zuerst die Verbindung mit der größten Dissoziationskonstante und dann die übrigen Verbindungen in der Reihenfolge ihrer Dissoziationskonstanten umgesetzt werden.

Résumé

On a effectué des titrages par haute fréquence de 5 Mc à l'aide d'un oscillateur à cristal. On a mesuré la variation de conductance de haute fréquence pendant un titrage, après chaque addition de solution titrante, en

déterminant la tension de polarisation de la grille à la fréquence de résonance à l'aide d'un voltmètre à tube à vide.

Les phénols monovalents suivants ont été examinés: phenol, o-, m- et p-crésols, α et β naphtols et 2-retenol. Parmi les phénols bi- et trivalents, la pyrocatéchine, la résorcine, l'hydroquinone, le pyrogallol et la phloroglucine ont été titrés. D'une façon générale, 0,5 à 5 mg de composé ont été dissous dans le mélange 2 : 1 benzène-méthanol puis titrés par une solution de méthylate de potassium dans le mélange 10 : 1 benzène-méthanol. Chaque groupement hydroxyle contenu dans une molécule donne lieu à une cassure de la courbe de titrage.

On a également titré un certain nombre de mélanges de phénols monovalents. Chaque composant du mélange produit une cassure de la courbe de titrage. Le premier composant titré est celui dont la constante de dissociation est la plus élevée, les suivants sont ensuite titrés par ordre de constante de dissociation décroissante.

References

[1] *Ch. N. Reilley* and *W. H. McCurdy*, Jr., Analyt. Chemistry **25**, 86 (1953).
[2] *J. L. Hall, J. A. Gibson*, Jr., *H. O. Phillips* and *F. E. Critchfield*, Analyt. Chemistry **26**, 1539 (1954).
[3] *M. Ishidate* and *M. Masui*, J. Pharm. Soc. Japan **73**, 487 (1953).
[4] *W. Y. Blaedel* and *H. V. Malmstadt*, Analyt. Chemistry **22**, 735 (1950).
[5] *J. S. Fritz*, Acid-Base Titrations in Nonaqueous Solvents. The G. Frederick Smith Chemical Company, Columbus, Ohio.
[6] *J. S. Fritz*, Analyt. Chemistry **25**, 179 (1953).
[7] *K. Takiura* and *Y. Takino*, J. Pharm. Soc. Japan **74**, 971 (1954).
[8] *E. S. Lane*, Analyst **80**, 675 (1955).

School of Criminology, University of California, Berkeley

A Microtechnique for Combined Analytical or Continuous Chromatography and Electrophoresis*

By

Arthur Karler, Charlotte L. Brown, and **Paul L. Kirk**

With 4 Figures

(Received April 2, 1956)

Within recent years, a large number of techniques and instruments for chromatography and for electrophoresis on paper as well as for combinations of the two have appeared. While both techniques are inherently well adapted to micro-scale operations, the full potentiality of this fact has rarely been utilized though microequipment and methods are available for both chromatography[1–3] and for electrophoresis on paper[4,5]. It appears that no combined procedures have been described for their simultaneous operation on a very small scale.

The method of performing continuous electrophoresis on a paper curtain with solvent flow at right angles to the electrical field was described by *Haugaard* and *Kroner*[6] and a number of other authors[7–11]. This type of procedure is especially well adapted for continuous preparative separations rather than for analytical purposes. *Karler*[12,13] has more recently described an apparatus similar to that of *Grassman* and *Hannig*[7] for large scale separations. It has certain advantages over the older designs. He also adapted[14] a similar principle to an apparatus of a size and capacity similar to the conventional paper electrophoresis equipment now widely available on the market. This apparatus has been useful for both analytical and small scale preparative application. Its required sample size is still much greater than is desirable for most criminalistic applications and for many clinical and research uses.

The apparatus** described here, which we term a micro electro-chromatophoresis unit, achieves several objectives desirable for many of the normal applications of this type of technique. It utilizes markedly

* Aided by grants from the Research Committee of the University of California, and Arthur D. Little, Inc.

** Available from the Microchemical Specialties Co., Berkeley, Calif.

smaller samples than any of the conventional equipment. It serves for chromatography alone, analytical paper electrophoresis alone, combinations of the two as an analytical method, and combinations of the two for small scale preparative uses.

Apparatus

The apparatus is shown in Fig. 1. It consists of a power supply unit which forms the base on which are placed the table for paper, reservoirs for buffer and other parts needed for the actual electrophoretic

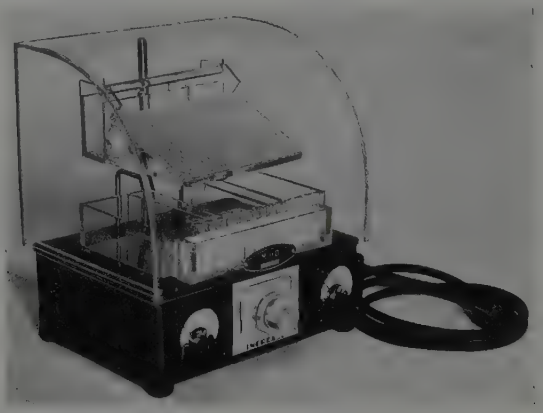

Fig. 1. Micro Electrochromatophoresis Apparatus

operation. The entire unit is $7^3/_4$ inches high, 7 inches wide and $5^1/_2$ inches deep (19.5 cm × 17.5 cm × 13.5 cm). The table on which the paper is spread is made from a sheet of plastic 3 by 4 inches (7.5 cm × 10 cm) and with a multiple pyramidal surface which minimizes contact of the wet paper with the surface. It is so mounted as to be adjustable in the horizontal position or tilted at angles of 10° or 23° toward the front. On the ends of the table and below it are the end vessels, $3^1/_4$ by 2 by $1^1/_2$ inches (8.1 cm × 5 cm × 3.7 cm) in outside dimensions and with a dividing strip to decrease contamination by electrode reaction products. Behind the table is mounted a set of three reservoirs for extra buffer or solvent which siphons downward over the paper during the operation to produce chromatographic separation in the direction approximately at right angles to the flow of current. With buffer, this is apparently an adsorptive phenomenon involving the paper fibers since partition would not be expected.

By replacing the reservoirs with a larger number of individual tubes, a very uniform gradient of p_H may be formed on the paper for separation of ampholytes by electrolysis in a p_H gradient as described for the boundary method by *Kolin*[15] and modified for paper by *Hoch* and *Barr*[16]. This technique is far better adapted to preparative than to analytical work.

In addition to the buffer reservoirs, a receiver chamber is provided consisting of a recessed holder and a number of microtubes to receive liquid from the drip points. In analytical use, this is conveniently omitted. Platinum wire electrodes are mounted in the base of the upper chamber

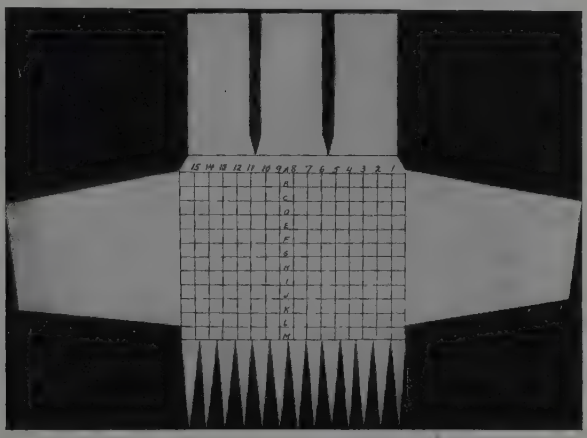

Fig. 2. Standard Paper Pattern

and connect with the power supply. The portion of the upper apparatus consisting of table support and the rear buffer reservoirs are a unit mounted on a vertical rod and may be moved up or down with respect to the end vessels. A sample container is available from which liquid samples may be led to a predetermined position on the paper by a thread or narrow paper strip. To accommodate anodic or cathodic migration, the sample container can be moved to either end of the apparatus. It is necessary for most preparative separations but is not ordinarily employed in analytical use. For the latter, the sample is added as a small volume of solution or in certain cases in the form of a dry powder.

Papers for use with the apparatus are normally cut in the pattern shown in Fig. 2[2]. A penciled grid is marked on them as shown to provide a convenient reference by which patterns may be rapidly and easily intercompared. The form shown may be used for preparative work for which numerous drip points are provided. The same form is suitable

for analytical operation but the drip points may be substituted by a slit apron extending well below the fractionation area to allow drainage and evaporation. Slits are essential to prevent current passage through the apron. Whatman No. 11 paper has been found most suitable for analytical use because its thinness permits small samples and allows more sensitive testing. Heavier grades of filter paper such as Whatman No. 1 or even 3 *M* are more suitable for preparative work because they allow faster movement of buffer across them.

A plastic cover protects the wet paper from dust or mechanical damage and reduces and controls evaporation from the open paper to a large extent. With Whatman No. 11 paper, the evaporation is sufficient even with the cover in place to make difficult the passage of enough buffer to wash the material to the drip tubes. Otherwise the evaporation is not detrimental to preparative use and does not prevent analytical operation with any paper tested.

Operation

Analytical. The instrument may be operated for electrophoretic analysis only, by dropping the table to the horizontal position, filling the end vessels with the appropriate buffer, placing the sample in the preferred manner, placing the plastic cover in position, and passing current at the chosen voltage or amperage. If it is considered desirable or necessary to protect the paper to a maximum degree from evaporation, it is sandwiched between two glass plates the same size as the table and the latter is replaced by the sandwich. Numerous variations in detail are possible depending on the operator's choice and experience. It should be noted that the operation of the microapparatus is considerably more rapid than with the conventional sizes of equipment, so that protection from evaporation is less critical.

Analytical operation as a combination method is just as simple and introduces a chromatographic factor which increases the information obtainable. The rear vessels are filled with the same buffer as used in the end vessels. The table is tilted, usually in the highest position, and the paper is placed with the grid occupying the table and all tabs immersed in their respective buffer vessels. The paper should be allowed to wet completely before any sample is added since this serves to elute certain impurities from the paper and establish equilibrium of flow. The wetting pattern may be made rectangular on the grid by painting the ends of the paper with a small paint brush dipped in the buffer of the end vessels. This is not essential and does not alter the flow of buffer on an equilibrated sheet. It does accelerate the equilibration.

The sample is added to the wet paper at a point along the upper edge of the grid. The current is turned on, usually at 350 v and the

cover put in place. Separation of blood serum proteins required about 1.25 hours of electrophoresis. Small samples could be added in a single portion but larger samples gave better patterns when they flowed from a very fine capillary to the paper at a slow rate. Typical patterns are shown in Fig. 3. The details of this separation will be published elsewhere.

The equipment was tested with a solution of acid fuchsin as an illustration of its ability to separate the constituents of a dye mixture. The efficiency of the separation is shown in Fig. 4. Four constituents of the dye could be distinguished.

It is important that the current and the rate of flow of buffer be so adjusted as to utilize the grid effectively. If the flow is too rapid, the lateral separation is unsatisfactory; if too slow, there is little chromatographic separation. While there is probably no partition effect under these conditions, it is found by experiment that marked differences in the values of what may be considered as the R_f of different constituents are shown with some materials, presumably owing to selective adsorption on the paper fibers. The run is stopped when enough time has elapsed to utilize most effectively the available area. The tabs extending into all reservoirs are cut and a warm-air dryer is applied. When dry, the paper sheet may be stained, sprayed, or otherwise examined to ascertain the pattern that has been formed.

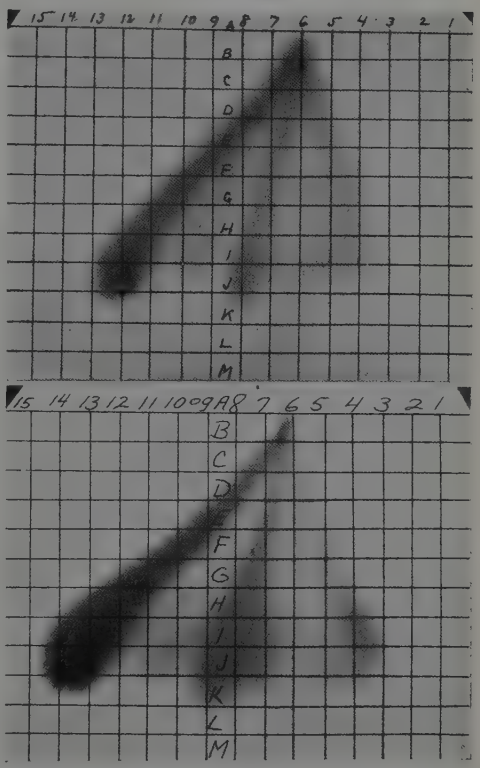

Fig. 3. Human Serum Patterns; about 20 microliter samples

Preparative Operation. The instrument is set up exactly as described above except that the receiver tubes are placed to surround the drip

points, and the sample feed vessel is put in place. After the buffer has completely wet the paper, the thread siphon or a capillary from the sample vessel is led to the chosen feed position on the paper to provide a slow and continuous feed of sample. Considerably more time is needed than for analytical separations because of the time necessary for the requisite volume to pass over the paper, and for the sample to siphon to the paper. The voltage is usually less than in analytical operation. Used in this manner, the resulting action is that of a continuous electrophoresis in which the chromatographic factor is virtually insignificant. The constituents separated by the current spread into an inverted V-shape, each constituent collecting in one or more tubes.

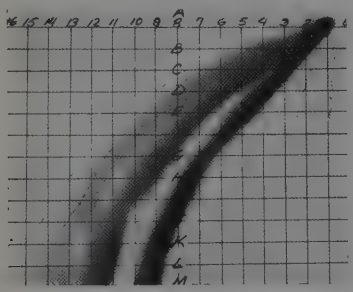

Fig. 4. Separation of the Components of Acid Fuchsin

Miscellaneous Uses. The apparatus is well suited for chromatography alone as was found earlier with the larger apparatus[14]. Details will be published elsewhere. The construction from acrylic plastic limits the types of solvents that may be used without damage to the equipment. No apparatus has yet been constructed from inert plastics such as polyethylene or Teflon.

A further interesting use has received preliminary tests with considerable success. This is the establishment of a p_H gradient electrophoresis on paper, similar to those previously described[16]. The end vessels are filled with two buffers of approximately equal ionic strength and different p_H values that bracket the range of interest. A series of short tubes is placed in the three rear solvent reservoirs, in each of which is placed a mixture of the same two buffers used in the end vessels. The mixture is so graded that small stepwise p_H changes are represented in these tubes. Instead of three feed tabs, the paper is cut so that a small tab is available for each tube. Tests of this system show that a very uniform p_H gradient is formed on the grid. It should be noted that the method of *Kolin*[15] is not well adapted to preparative use because of the difficulty of removing the ampholyte occupying any given boundary. On paper, the material flows directly to a drip point and receiver so that preparative separation is greatly facilitated. Little analytical value is at present to be ascribed to this technique. The investigation of separations in a p_H gradient with this equipment is in a preliminary state and detailed results will not be included here. It is evident that the extremely precise

sharp bands formed will make the separations more than normally clean and uncontaminated.

It was noted throughout this investigation that the separations achieved by electrochromatophoresis appeared to be greater than the sum of the equivalent chromatography and electrophoresis alone under corresponding conditions. The reasons for this effect are probably two: 1. The passage of current rapidly removes salts and other light ion species from the sample, thereby eliminating the disturbing effect of these constituents and allowing more effective separation by the solvent alone. 2. The continuous replenishment of buffer augments the separation by electrophoresis because it diminishes the increase in current carried by the buffer constituents alone as evaporation takes place. Thus, it appears that the two processes actually augment each other mutually, so that if they were carried out in succession instead of simultaneously, the effects would be smaller.

Summary

A micro apparatus is described for carrying out electrophoresis, chromatography, or a combination of the two, termed electrochromatophoresis, for both analytical and preparative separations. The scale of operation is in the microgram range and is considerably smaller than has been described for this type of technique. Applications to blood and dye solution are illustrated.

Zusammenfassung

Eine Mikroapparatur für die Ausführung analytischer und präparativer Trennungen durch Elektrophorese, Chromatographie oder eine Kombination der beiden, die die Autoren als Elektrochromatophorese bezeichnen, wird beschrieben. Der Arbeitsmaßstab fällt in das Mikrogrammgebiet und ist beträchtlich kleiner als bisher für diese Arbeitsweise beschrieben. Als Beispiele werden Trennungen der Bestandteile von Blut und von Farbstofflösungen angegeben.

Résumé

Description d'un appareil de «micro-électrochromatophorèse» permettant d'effectuer des séparations analytiques ou préparatives par électrophorèse ou chromatographie ou encore par une combinaison de ces deux techniques. Les travaux sont exécutés dans le domaine du microgramme c'est-à-dire à échelle beaucoup plus faible que dans toutes les techniques précédemment décrites. Les auteurs donnent comme exemples la séparation des constituants du sang et de solutions de matières colorantes.

Literature

[1] *J. C. Underwood* and *L. B. Rockland*, Analyt. Chemistry **26**, 1553 (1954).
[2] *L. B. Rockland* and *J. C. Underwood*, Analyt. Chemistry **26**, 1557 (1954).

[3] *R. Munier*, Bull. soc. chim. biol. **35**, 1225 (1953).
[4] *M. Ganzin, M. Macheboeuf* and *P. Rebeyrotte*, Bull. soc. chim. biol. **34**, 26 (1952).
[5] *F. Hagihara*, J. Pharm. Soc. Japan **74**, 999 (1954).
[6] *F. Haugaard* and *T. D. Kroner*, J. Amer. Chem. Soc. **70**, 2135 (1948).
[7] *W. Grassmann* and *K. Hannig*, Z. physiol. Chem. **292**, 32 (1953).
[8] *H. H. Strain* and *J. C. Sullivan*, Analyt. Chemistry **23**, 816 (1951).
[9] *T. R. Sato, W. P. Norris* and *H. H. Strain*, Analyt. Chemistry **24**, 776 (1952).
[10] *E. L. Durrum*, J. Amer. Chem. Soc. **73**, 4875 (1951).
[11] *G. Dicastro* and *M. San Marco*, J. Chem. Soc. London **1954**, 4157.
[12] *A. Karler*, Abstr. Papers 125th Meeting, Amer. Chem. Soc., p. 16c (1954); Ind. Eng. Chem. **46**, 17 A (1954).
[13] *A. Karler* and *M. L. Spivack*, Federation Proc. **14**, 1516 (1955).
[14] *A. Karler*, Federation Proc. **14**, 755 (1955).
[15] *A. Kolin*, Proc. National Acad. Science **41**, 101 (1955).
[16] *H. Hoch* and *G. H. Barr*, Science **122**, 243 (1955).

School of Criminology, University of California, Berkeley

Identification of Minute Amounts of Metals and Alloys by Electrosolution and Electrophoresis*

By

Charlotte L. Brown and **Paul L. Kirk**

With 4 Figures

(Received April 2, 1956)

When minute fragments of metals and alloys must be identified and their components detected, either spectrography or microchemical analysis is commonly utilized. Spectrographic analysis is ordinarily the method of choice except that many samples are so small as to preclude the use of the simple direct current arc. In addition, when the sample constitutes evidence in legal matters, the complete destruction of the sample in the arc is not desirable. Microchemical methods necessitate special methods of solution, and multiple tests that are very time consuming, and they also may require destruction of the whole sample. They carry the danger that some constituents present in reasonable percentage may be overlooked.

Two identical spectra produced from two samples of an alloy or metal constitute the best possible proof of identity of two samples. To obtain such identical spectra, obvious to a jury as well as to the analyst, can be very difficult especially when the samples are very minute. This is especially true when the lower limit of sensitivity of the particular technique is being approached. To be certain of reliable results may require a high degree of skill, and in any case it requires expensive equipment which is not always available.

This communication describes a technique for dissolving minute amounts of metals and alloys and identifying their constituents by electrophoretic separation and location of the separated metals by means of spot tests suitable for application on filter paper. The equipment is

* Aided by grants from the Research Committee of the University of California and Arthur D. Little, Inc.

simple and inexpensive, and little experience is required to operate it. Several samples of a single metal fragment may be analyzed while retaining most of the fragment intact, which is important as a record of the original evidence.

Equipment

A simple direct current power supply of any type suitable for electrophoresis on paper is satisfactory for electrosolution of metal samples. For this phase of the analysis, the potential rarely need exceed 90 v to yield a current of from 20 to 40 ma which is adequate to dissolve the metal. For the electrophoretic separation that follows, it is necessary that a higher voltage be available, and this must be considered if the same power supply is used for both purposes.

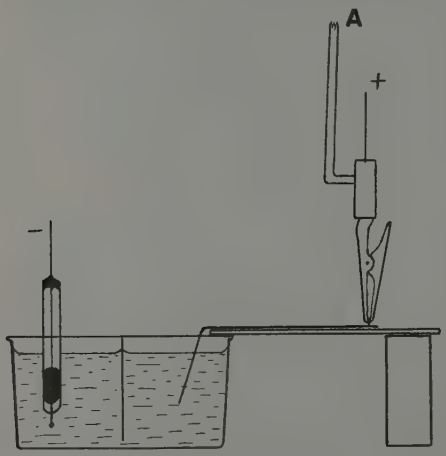

Fig. 1. Electrosolution Apparatus (approximately one-third size). *A* Attachment for Micromanipulator

To the power supply output was attached an apparatus shown schematically in Fig. 1. It consisted of a single end vessel and paper support, along with a special clip to hold the small metal sample. The end vessel was a small polyethylene container in which was placed a plastic separator to minimize contamination of the paper by electrode products. The separator was not essential for the electrosolution, but desirable if the same end vessel was to be used for paper electrophoretic separation of the metals.

The clip holder was made from a small "bulldog" clamp by filing or grinding off the serrations of the jaws until a smooth gripping surface was obtained. The jaws were then ground on the outside until they were pointed and narrow. The modified jaws were capable of grasping and holding firmly very minute fragments of metals. To avoid electrolyzing metal from the jaws themselves, the outside was well lacquered. Any lacquer on the gripping surface was then removed with fine abrasive cloth. The clamp was connected to the positive terminal of the power supply output. For convenience in manipulating the smallest samples,

the clamp was sometimes attached through a glass rod support to a micromanipulator tool post. A simple rack and pinion or screw type is satisfactory, and if a manipulator is not available, a simple screw device for raising and lowering the clip is adequate. Except where the metal fragment is extremely small, the clamp may be held in place by the hand.

A strip of Whatman No. 11 filter paper, ordinarily $1^1/_2$ inches (3.7 cm) wide and cut as shown in Fig. 2 was supported by a glass plate overlapping the end vessel. The broad end of the paper dipped into the electrolyte solution as in electrophoresis. The narrow end of the hook portion was so designed as to allow a symmetrical flow of current to the metal fragment in contact close to the end of the paper. The electrode (platinum wire) dipping into the end vessel was connected to the negative terminal of the power output.

Fig. 2. Shape of Filter Paper ($^2/_3$ full size)

Separation of the metals dissolved by the above process was sometimes performed in a simple microelectrophoresis outfit with two end vessels similar to that described and a paper bridge supported by a length of plastic mesh or a strip of plastic molded with small pyramidal points to minimize contact of the paper with the support. The power was supplied by a direct current power supply capable of delivering 400 v and 50 ma of current. Electrophoresis was performed in the usual fashion, and required current flow for a period of about 40 minutes. The electrochromatophoresis apparatus described previously[1] could be employed for simple electrophoresis or used in its combination capacity for electrochromatophoresis. Since neither procedure showed any marked superiority over the other with the exception that three or more samples could be run simultaneously by simple electrophoresis, the choice of equipment is based on availability.

Procedure

The electrosolution apparatus was assembled as illustrated, and the metal fragment placed in the clamp so as to protrude, but be gripped firmly. The end vessel was filled with a solution containing approximately 8 g KCl, 2 g KBr and 1 ml conc. HCl per liter. The No. 11 Whatman filter paper was cut and placed in the end vessel and on the support plate as shown and the metal fragment lowered so as just to contact the wet paper. The power supply was turned on at a voltage not exceeding 90 to 100 v for 0.5 to 1 minute. The metal dissolved in this electrolysis

was concentrated in the small tip of the paper which was then cut off and dried. The amount of metal removed in a short electrolysis, was so small that the appearance of the metal fragment was rarely altered, and numerous samples could be removed for repetition of the analysis without seriously damaging the fragment as evidence.

The dissolved metals were separated as a matter of convenience with the electrochromatophoresis apparatus or with the simple paper electrophoresis apparatus described. The dry tab containing the sample was placed at the sample position of the appropriate paper which had been previously wet with a buffer consisting of 5 ml of lactic acid to which was added NaOH to give a final p_H of 3 to 4, dissolved in 1 l. The paper was not covered during electrophoresis. Aside from this, both procedures were conventional from this point on. Voltages from 350 to 400 were found suitable, requiring about 0.5 to 1 hour to produce satisfactory separation by either method. The details of electrolysis were not found to be important in isolating the constituents for identification but would require accurate reproduction if two or more samples were to be directly compared as to pattern produced.

Detection of the separated metals was found to be the most difficult portion of the technique and was the limiting factor with small samples. This subject has been treated at length in several publications[2–5]. Numerous of the methods described in the literature were tested and a combination of procedures was developed which gave excellent results with fractional microgram quantities of metal.

The wet paper was first fumed over a bottle of concentrated ammonia. This alone developed spots at times. It was then sprayed with an atomizer charged with a mixture of kojic acid and 8-hydroxyquinoline[6] in ethyl alcohol. At this point the paper was immediately dried and examined both visually and with ultraviolet light, most of the areas or spots being visible in one or the other or both. The areas were then streaked with a small brush carrying a carbon tetrachloride solution of dithizone[7] which was useful in identifying the metal and which sometimes developed further areas. Finally, the paper was sprayed with Eriochrome Black T in ethyl alcohol which developed additional metals and aided in identification.

Results

Metals tested specifically included lead, zinc, copper, aluminium, iron, mercury, manganese, magnesium, cadmium, bismuth, tin, nickel, chromium, and antimony. Salts of these metals were subjected individually to electrophoresis in the same manner and tests for them studied. A summary of the appearance of the separated metal spot with various reagents finally adopted is given in Table I. In general, the behavior

of a given metal with a particular test was consistent. However, in a few instances variations of color were noted, and bismuth was not consistent in its appearance under ultraviolet light after treatment with kojic acid and 8-hydroxyquinoline.

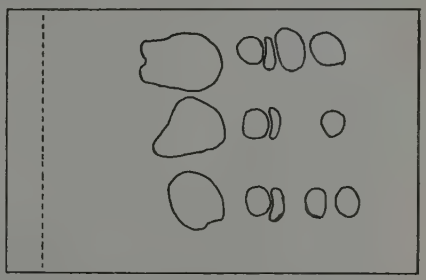

Fig. 3. Separation Patterns of Three Steels From Tools. Origin at Dotted Line

A series of binary salt mixtures was tested to determine which pairs could be separated. They include Cu-Zn, Pb-Al, Fe-Mg, Cd-Bi, Al-Zn, Al-Fe, Cu-Ni, Mg-Cd, Zn-Pb, Cu-Hg, and Cr-Ni. These could all be separated and identified. Various more complex mixtures in the form of alloys were then tested by electrosolution and electrophoresis. Satisfactory separation and identification resulted with Babbitt metal (Cu, Sb, Sn), chrome nickel alloy (three areas obtained), copper nickel alloy (three areas separated), aluminium bronze, stainless steel (several samples), brass. bronze, nichrome, tool steel, and variations of common alloys. Fig. 3 is a representation of comparative areas obtained simultaneously with steel from three different steel tools. Areas obtained with samples of two different chromium nickel alloys are shown diagramatically in Fig. 4. A solution containing Mn, Cd, Co, and Ni was tested and all four metals were distinctly separated.

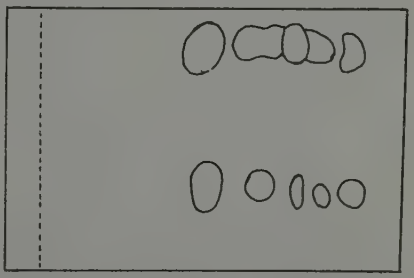

Fig. 4. Separation Patterns of Two Different Chrome Nickel Alloys. Origin at Dotted Line

It is evident that with the very minute samples of metal utilized for identification by this method, trace constituents would not be expected to appear. Larger samples and modification of the technique might well allow trace constituents to be detected since only traces of the major constituents are employed in the technique described. While the method is inherently qualitative, it should be noted that differences in ratios of major constituents were often noted, and similar alloys sometimes gave identical patterns except that one would yield an extra spot not found in the others. In one instance, a threaded brass

attachment that had broken under circumstances indicating inherent weakness showed considerably less zinc at the point of fracture than in the unfractured portions. The fact that this comparative analysis could be performed without detriment to further metallographic, spectroscopic or chemical analysis, and with a minimum of time and effort indicates that this technique may well be a useful supplement in the study of metal failure and related matters, as well as in direct identification of alloys, and comparison of compositions. A major advantage is the ease with which an unknown alloy may be rapidly analyzed for its major constituents, and compared with other alloys of known or unknown composition.

Table I. Tests For Metal Spots

Metal	Kojic Acid-Hydroxyquinoline		Dithizone	Eriochrome Black T
	Visible	Ultraviolet		
Aluminium ...	Pale Yellow	Brown, Yellow, Green	—	—
Antimony	—	Orange	—	—
Bismuth	Yellow	Variable	—	—
Cadmium	Yellow	Orange	Orange	Pink
Chromium	Orange Gray	Dark	—	Brown Orange
Copper	Yellow	Dark	Dull Orange	Pink
Iron	Gray Brown	Dark	—	Orange
Lead	Yellow	Pink Orange	Red Orange	Pink
Magnesium ...	—	Bright	—	Pink
Manganese	—	Dark	—	Pink
Mercury	Yellow	Dark	Red Orange	—
Nickel	Yellow	Dark	—	Pink
Tin	Gray	Dark	—	Pink
Zinc	Light Yellow	Bright Yellow	Pink	Lavender

Summary

A simple scheme is described for extraction from the surface of metals and alloys of minute amounts of material in a state suitable for direct electrophoretic separation and analysis. The techniques of electrophoretic separation and of identification of the metals after separation are discussed with reference to examples and illustrations. The technique is suited for the investigation of very small particles of metals and alloys.

Zusammenfassung

Ein einfaches Verfahren zur Ablösung außerordentlich kleiner Materialmengen von der Oberfläche von Metallen und Legierungen, die in der Form kleiner Teilchen vorliegen können, wird beschrieben. Trennung durch Elektrophorese und Nachweis der Metalle nach elektrophoretischer Trennung werden unter Hinweis auf Beispiele besprochen.

Résumé

Description d'un procédé simple permettant de détacher de la surface de métaux et d'alliages des quantités de substances extraordinairement faibles y adhérant sous forme de petites particules. Les auteurs donnent quelques indications relatives à des exemples concernant la séparation de métaux par électrophorèse et leur identification après séparation électrophorétique.

Literature

[1] *A. Karler, C. L. Brown* and *P. L. Kirk,* Mikrochim. Acta [Wien] **1956,** 1585.

[2] *R. J. Block,* Paper Chromatography: A Laboratory Manual. New York: Academic Press. 1952.

[3] *E. Lederer,* Chromatography. Amsterdam: Elsevier. 1953.

[4] *O. C. Smith,* Inorganic Chromatography. New York: Van Nostrand. 1953.

[5] *J. N. Balston* and *B. E. Talbot,* A Guide to Filter Paper and Cellulose Powder Chromatography. London: H. Reeve Angel Co. & Maidstone, W. & R. Balston Ltd. 1952.

[6] *F. H. Pollard, J. F. W. McOmie* and *I. I. M. Elbeih,* J. Chem. Soc. London **1951,** 466, 470.

[7] *F. H. Burstall, G. R. Davies, R. P. Linstead* and *R. A. Wells,* J. Chem. Soc. London **1950,** 516.

Department of Chemistry, Brooklyn College, Brooklyn 10, N. Y.

Slide Test for Fructose and Other Ketohexoses

By

R. K. Maurmeyer, E. M. Livingston, and **R. Michaels**

(Received April 19, 1956)

The detection of small quantities of fructose in presence of other reducing sugars is of practical interest. A color test was described several years ago[1]. Fructose and other ketohexoses or sugars which yield ketohexoses on hydrolysis give a green coloration with a solution of phenol and sulfuric acid in glacial acetic acid. Aldohexoses give a yellow to reddish brown coloration which develops much more slowly so that it is possible to detect fructose and other ketohexoses in presence of reasonably large amounts of other reducing monosaccharides.

Reagent: 13 g phenol are dissolved in 74 ml glacial acetic acid and 13 ml concentrated sulfuric acid are added to this solution.

Apparatus: microscope slides; cover slips of 18 mm edge; capillary pipets of 1 mm bore in the wide part and 15 cm length.

Performance of Test

(a) *With Aqueous Solutions of Fructose.* An aliquot of solution which contains at least 1 to 2 μg of fructose is evaporated upon the center of a slide so that the residue is collected within a circle of 2 to 3 mm diameter. The slide is placed upon the opening of a 250-ml Erlenmeyer flask in which water is kept boiling. The solution to be evaporated is added in portions of about 2 μl to the center of the heated area of the slide.

A square cover slip is placed upon the residue so that the latter appears below the center of the slip. The reagent is added by running the tip of a capillary pipet along the left edge of the cover slip so that a small amount of reagent is drawn into the space between slide and cover slip and moves toward the residue. If added correctly, the reagent will fill one half of the space between slide and cover slip and cover half of

the residue. Good results are obtained with small amounts of fructose if the cover slip is pressed against the slide while adding the reagent. This may be done with the finger or the eraser end of a pencil. The small amount of reagent entering the narrow space thereby advances with a straight front until half the space is filled.

The whole space between slide and cover slip may be filled by finally applying reagent in the described manner along the right edge of the cover slip until the two portions of reagent meet in the center of the residue. Again, the flow and amount of reagent may be regulated by pressing the cover slip against the slide.

For the development of the coloration, the slide is again placed upon the mouth of the Erlenmeyer flask and heated for approximately one minute. Longer heating causes fading of the green coloration. A green line forms at the boundary of the reagent through the center of the cover slip if the reagent was added from one edge only of the slip. If the reagent was added from two sides, the green line will appear where the two reagent fronts merged in the center of the residue. The sensitivity of the test is improved by keeping as small as possible the volume of reagent in contact with the sugar. It is also necessary to keep the cover slip away from the edge of the slide; otherwise the reagent between slide and cover slip may be diluted by condensing steam from the heating bath.

(b) *With Mixtures of Fructose and other Sugars.* The procedure is slightly modified. The sugar solution is evaporated on the slide to leave a circular residue of 3 to 5 mm diameter. Little or no pressure is applied to the cover slip while the reagent is added. An excess of reagent must be avoided, but the residue must be completely covered by the reagent. The green color appears along the edge of the circular residue, or patches of green form somewhere within the sugar residue.

Sensitivity

Clearly positive tests were obtained with 1 to 2 μg fructose, 4 μg raffinose hydrate, 3 to 4 μg sucrose, the same amount of l-sorbose, and 2 μg inulin. Two micrograms of fructose could be readily detected in presence of the stated quantity of any one of the following substances: 100 μg d-galactose, 60 μg dextrose, lactose, melibiose or inosite, 30 μg mannose, 20 μg arabinose, 10 μg rhamnose, 2 μg ribose, and 0.5 μg xylose.

Summary

Fructose and other ketohexoses give a green coloration when heated with a solution of phenol in glacial acetic acid to which some concentrated sulfuric acid has been added.

Zusammenfassung

Fruktose und andere Ketohexosen geben bei leichtem Erwärmen mit einer Lösung von Phenol in Eisessig, der etwas konz. Schwefelsäure zugesetzt wurde, eine grüne Färbung.

Résumé

Le fructose et d'autres cétohexoses donnent naissance à une coloration verte lorsqu'on les chauffe avec une solution de phénol dans l'acide acétique glacial à laquelle on a ajouté un peu d'acide sulfurique concentré.

Literature

[1] *R. K. Maurmeyer, E. M. Livingston* and *H. Zahnd*, J. Biol. Chem. **185**, 347 (1950).

Contribution from the Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan

Microdetermination of Halogens in Organic Compounds

(Studies in Organic Elementary Analysis, Part XVI)

By

Tetsuo Mitsui and **Hiromu Sato**

With 6 Figures

(Received April 27, 1956)

Numerous methods for the microdetermination of halogens in organic compounds have been reported[1]. Since almost all of the methods require a titration or filtration procedure after the sample has been decomposed, the procedures are troublesome and time-consuming.

Recently *Safford* and *Stragand*[2] have proposed a method for the microdetermination of halogens, by which the substances are burned in an atmosphere of oxygen, and the liberated halogen is absorbed by a roll of silver gauze; the resulting gain in weight of the gauze represents directly the halogen content of the sample. *Kono* et al.[3] have reported improvements in the analytical conditions and have described the treatment of the silver gauze.

As this method for halogen determination seemed to be simple, the present authors were interested in it, but unfortunately the results obtained were not precise enough to allow the method to be recommended. The most outstanding trouble seems to arise from handling the absorbent without any container. As a consequence, silver halide formed on the surface of the silver gauze adheres to the inside wall of the combustion tube, even if the gauze is maintained at a temperature lower than the melting points of the silver halides involved.

Another unsatisfactory feature of the method, is that the silver gauze has a low capacity for absorption, and not more than two or three determinations can be carried out with one gauze on samples which contain relatively large amount of halogen.

In the modified method described here, electrolytic silver wool packed into a special absorption-funnel is used as the absorbent for halogens. The imperfections of the silver gauze method are completely removed by this modification.

I. Apparatus

The assembled apparatus is shown in Fig. 1. It is the same as that for carbon and hydrogen microdetermination apart from the combustion tube and a silver-heater.

G (in Fig. 1) is a gas-holder (10 l capacity)[4]; FL is a flow-meter[5]; P is a pre-heater[5] with an absorber A; F_1 is a pre-heater combustion

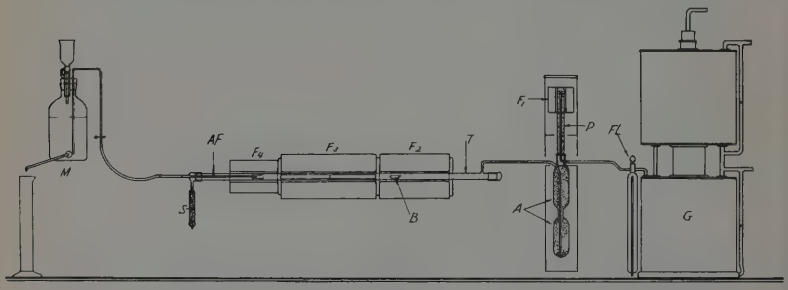

Fig. 1. The Apparatus

furnace (700–750° C, 5 cm long)[4]; F_2 is an automatic combustion furnace[6]; F_3 is a stationary furnace (750–800° C, 20 cm long)[4]; S is a soda-asbestos tube by which the air aspirated into the combustion tube is purified; M is a Mariotte bottle.

The electrolytic silver wool for absorbing halogens is packed into the absorption-funnel AF made of transparent quartz. After the combustion has been completed, the absorption-funnel is withdrawn, and the increase in weight of the funnel and packing is determined. The pad of absorbent has both high capacity and high efficiency.

The combustion tube and the absorption-funnel are illustrated in Fig. 2. The absorption-funnel is connected by means of a piece of polyethylene tubing to the internal tube of a socket-cap of glass without any lubrication. A soda-asbestos tube is connected to the side tube of the socket-cap. To connect the socket-cap to the combustion tube, any normal lubricant may be used. While the combustion is proceeding, purified oxygen is passed through the combustion tube at the measured rate of 10 ml per minute from a gas-holder. The drainage tube of the Mariotte bottle is lowered and the rate of water dropping into a graduated

cylinder is adjusted to indicate 20 ml per minute. Consequently air is aspirated into the combustion tube through the soda-asbestos tube at a rate of about 10 ml per minute. The aspirated air streams in the reverse direction to the oxygen flow and is then exhausted, together with the oxygen, into the Mariotte bottle. The reverse flow of the air ensures that the combustion products are drawn completely into the absorption-funnel. Just beyond the socket-cap, a glass tube containing a piece of filter paper wetted with potassium iodide-starch solution is inserted.

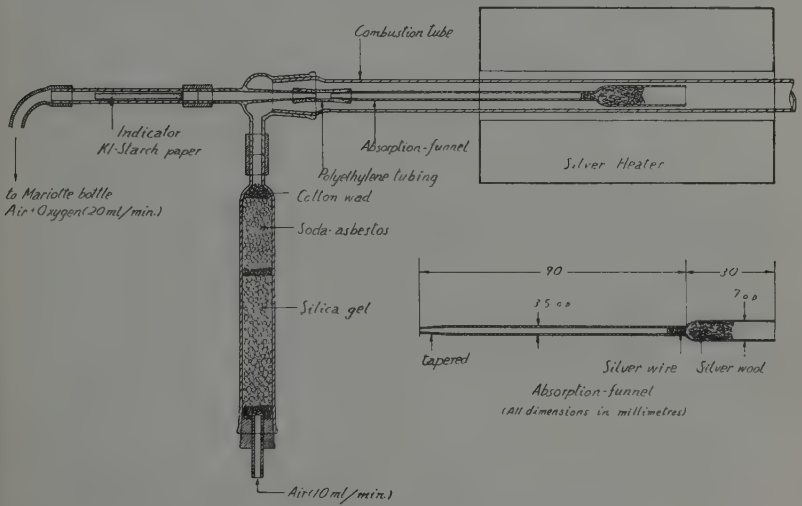

Fig. 2. Absorption-Funnel and Combustion Tube

The paper indicates sensitively by a marked coloration the presence of a small amount of halogen in the exhaust gases, so that it is always possible to recognize the point where the absorbent begins to fail. However the introduction of the indicator paper is not absolutely necessary for routine analysis, since electrolytic silver wool has very long absorbent life.

The absorption-funnel should have the dimensions shown in Fig. 2. A small wad of silver wire (0.1 mm diameter) is placed as a support for the absorbent as shown. Electrolytic silver wool wetted with electrolyte solutions is packed loosely into the funnel and then the stem of the funnel is connected to a water suction pump. The silver wool is formed into a pad by gentle suction. To prevent channelling, the silver wool should be distributed uniformly. It is washed with about 100 ml of distilled water and then with about 10 ml of methanol, by aspirating these liquids through the pad. The pad is then pressed carefully (but not too firmly)

into position by means of a fine glass rod. The funnel is warmed over an open flame and suction with the water pump is continued until the funnel and packing are dry.

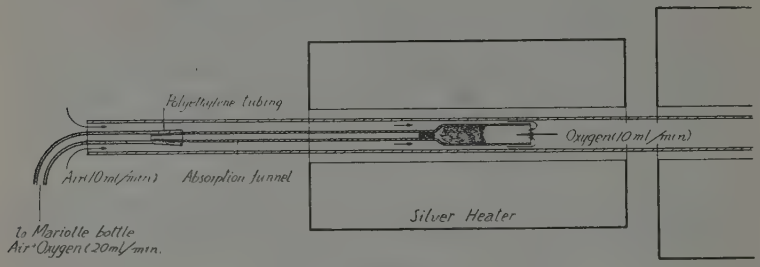

Fig. 3. A Simplified Setting-up

If the laboratory air is not contaminated with acid fumes or air-borne dust, the socket-cap and the soda-asbestos tube can be dispensed with, so that the apparatus can be much simplified as shown in Fig. 3. The exit end of the tube remains open to the atmosphere. The absorption-funnel is simply introduced into the combustion tube. Oxygen (10 ml/min) supplied from the gas-holder and air (10 ml/min) from the open end of the combustion tube are aspirated by the Mariotte bottle at a total flow-rate of 20 ml per minute.

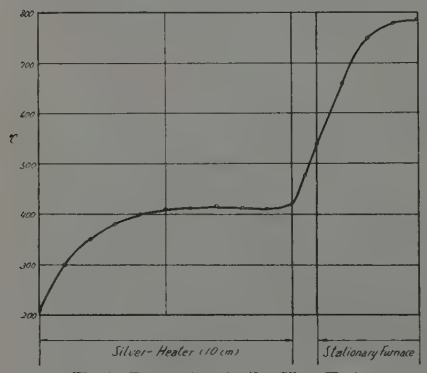

Fig. 4. Temperature in the Silver-Heater

The measured temperature distribution in the silver-heater is shown in Fig. 4. The figure shows that the uniform temperature region of the furnace lies in the front half near the stationary furnace.

II. Weighing of the Absorption-Funnel

The absorption-funnel must be weighed accurately. Since a mixture of oxygen and air is allowed to pass through the absorption-funnel during the combustion, some excess oxygen remains in the funnel immediately after it has been detached from the combustion train. It is to be expected, that the absorption-funnel will alter in weight in an atmosphere of air.

The rate of replacement of oxygen by air is dependent on the shape of the funnel. Fig. 5 shows the change in weight of a funnel with the dimensions shown in Fig. 2. The graph shows that the oxygen in the funnel is gradually replaced by the air and that the weight becomes constant after 8 minutes standing on the balance. The rate of change in weight must, however be different when the absorption-funnel has been heated. The formation of a water skin on the surface must cause a gain in weight. In order to examine the change in weight of the funnel, it was heated in the silver-heater at 400–500° C, and oxygen was passed in a manner similar to that used for an actual analysis. Five minutes after the funnel was withdrawn from the combustion train, it was placed on the balance, and was weighed. The result obtained is shown in Fig. 6 which indicates the gain in weight caused by the formation of the water skin on the surface of the funnel. The results show that at least thirteen minutes of waiting time is required before weighing.

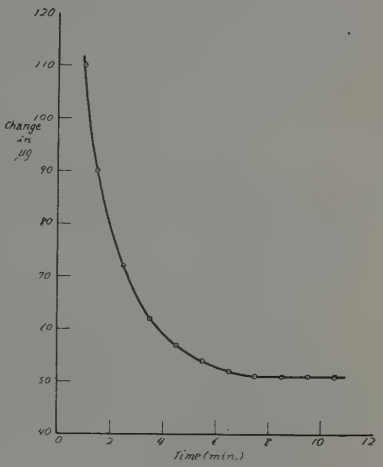

Fig. 5

Wiping before weighing is not necessary, as the funnel is handled by forceps or a piece of clean paper, and is never touched directly by hand.

Blank values were very small, and their calculated standard deviation was almost the same as that of the balance itself. The very small blank values seem to contribute significantly to the high accuracy of the results obtained by this method.

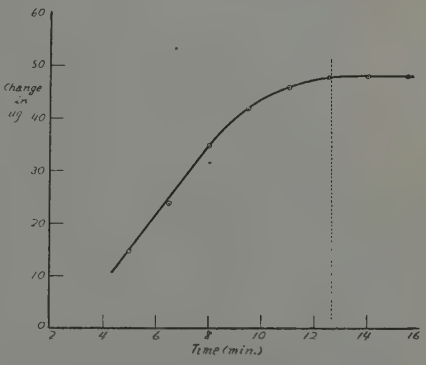

Fig. 6. Optimum Time Interval Between Detaching and Weighing the Absorption-Funnel

III. Electrolytic Silver Wool[7]

In preparing the electrolytic silver wool, the following cell is used. Electrolyte solution: 0.7 g of silver nitrate in 0.5% nitric acid.

Anode: Silver plate (0.5 mm thickness, 5 × 10 cm).

Cathode: Silver wire (1 mm ⌀, 15 cm long).

The crystals of electrolytic silver produced at a plate voltage of 1.3 are in the form of closely interwoven clusters, and are stored in a wide-necked bottle under electrolyte solution. As described above, washing and drying of the silver wool are carried out after it is packed into the absorption funnel.

IV. Procedure

Conditioning of the absorption-funnel: The newly packed absorption-funnel is inserted in the combustion tube, and is maintained at 400–500° C for 30 minutes by a silver-heater while streams of oxygen and air are passed as indicated above. It is difficult to wash silver nitrate completely from the surface of the electrolytic silver wool, but the small amount remaining is decomposed to silver by the heating operation. Decomposition of the silver nitrate is indicated by the coloration of the starch-iodide indicator paper (since nitrogen dioxide liberates iodine from potassium iodide). After 30 minutes under these conditions, the absorption-funnel should be withdrawn from the combustion tube and detached from the train. It is weighed after 20 minutes waiting time. This procedure is repeated until constant weight is attained. In most cases a single heating is sufficient to achieve this.

Combustion procedure: The substance (3–7 mg) is weighed in a platinum boat and is introduced into the combustion tube. Oxygen is passed through at the measured rate of 10 ml per minute. The socket-cap with the absorption-funnel and soda-asbestos tube is fixed to the exit end of the combustion tube. The drainage tube of Mariotte bottle is then lowered so that the outflow of water indicates 20 ml per minute. The sample is then burned automatically by the furnace F_2 (cf. Fig. 1) as for a carbon-hydrogen determination[6]. When the combustion is completed, the absorption-funnel is transferred to a rack support for a few minutes, and the weighing is completed 20 minutes after removing the funnel from the combustion train. Many successive determinations can be carried out with this absorption-funnel without washing or replacing the absorbent. In routine combustion two absorption-funnels are used alternately. The combustion of a sample is carried out with one of these while the other is being weighed. In this way ten determinations are easily carried out in a day (8 hours).

V. Discussion

Capacity of the absorbent for chlorine: Succesive determinations were carried out with an absorption-funnel until the analytical values obtained dropped markedly below the theoretical value. The amount of chlorine

retained per unit weight (1 g) of the absorbent, as calculated from the total amount of retained chlorine, was taken as the capacity of the absorbent. The capacity of a roll of silver gauze (40 mesh, 5 × 10 cm) was also tested for comparison. The capacity is mainly dependent on the surface area of the absorbent, and on the temperature at which the absorbent is maintained. In all the experiments the absorbent was maintained at 425° C.

The results obtained are shown in Table I.

From these it can be seen that the capacity of electrolytic silver wool is 40–50 times as great as that of silver gauze, and an absorption-funnel containing 0.37 g of electrolytic silver wool absorbs about 60 mg of chlorine quantitatively. Consequently about 40 successive determinations can be carried out with an absorption-funnel if 1.5 mg of chlorine is liberated from the sample in each determination.

Table I. Capacity of absorbent

	Silver gauze	Electrolytic silver wool
Approximate weight of absorbent	6 g*	0.37 g**
Approximate total amount of chlorine absorbed quantitatively	22 mg	60 mg
Capacity of absorbent (mg/g)	3.7	162

* A roll of silver gauze (40 mesh, 5 × 10 cm).

** Average filling of an absorption-funnel; an empty funnel weighs about 2 g, and a packed funnel weighs about 2.4 g.

Table II. Effect of the flow-rates of oxygen and air on the precision of the analytical results

Expt. group	Analysis No.	Sample	Flow-rate of oxygen (ml/min.)	Flow-rate of air (ml/min.)	n	$\bar{x}$-Theory (%)	σ (± %)
I	1—22	*A*	10	0	22	— 0.130	0.219
II	23—41	*B*	10	0	19	— 0.268	0.420
III	42—55	*B*	10	5	14	+ 0.031	0.124
IV	56—73	*B*	10	10	18	— 0.073	0.117
V	74—87	*B*	15	15	14	— 0.044	0.116
VI	88—98	*B*	5	10	11	— 2.27	2.77

In all the series, the silver-heater and the stationary furnace were maintained at 435° C and 750—800° C respectively.

Sample *A*: D. D. T. (Cl% = 50.01); Sample *B*: α-Benzene hexachloride (Cl% = 73.14).

Flow-rate of air is that of the air aspirated into the combustion tube through the soda-asbestos tube.

n: Number of the analyses; $\bar{x}$: Average of the results; σ: Standard deviation of the series (Standard error of estimate).

Table III. Analytical results obtained under the conditions of Table II

No.	Sample (mg)	Found (%)	Deviation (%)	No.	Sample (mg)	Found (%)	Deviation (%)
1	4.455	49.83	— 0.18	50	3.540	73.19	+ 0.05
2	3.808	49.40	— 0.61	51	3.645	73.20	+ 0.06
3	4.628	49.57	— 0.44	52	3.312	73.07	— 0.07
4	3.818	49.40	— 0.61	53	4.042	73.18	+ 0.04
5	3.620	49.81	— 0.20	54	3.292	73.16	+ 0.02
6	4.442	49.95	— 0.06	55	3.831	73.09	— 0.05
7	2.812	49.72	— 0.26	56	3.140	73.15	+ 0.01
8	3.769	50.05	+ 0.04	57	3.758	73.18	+ 0.04
9	7.000	50.00	— 0.01	58	4.248	73.09	— 0.05
10	5.404	49.87	— 0.14	59	4.008	72.85	— 0.29
11	7.742	49.88	— 0.13	60	3.782	73.19	+ 0.05
12	2.625	49.90	— 0.11	61	3.643	72.96	— 0.18
13	3.340	49.85	— 0.16	62	4.492	73.17	+ 0.03
14	4.592	50.08	+ 0.07	63	3.706	73.07	— 0.07
15	2.663	49.68	— 0.33	64	2.911	72.92	— 0.22
16	2.880	49.90	— 0.11	65	4.859	73.04	— 0.10
17	3.993	49.96	— 0.05	66	5.351	73.13	— 0.01
18	2.290	50.21	+ 0.20	67	3.563	72.99	— 0.15
19	6.405	50.12	+ 0.11	68	2.643	72.95	— 0.19
20	7.062	49.99	— 0.02	69	6.157	73.10	— 0.04
21	4.646	50.04	+ 0.03	70	2.837	73.14	0
22	6.277	49.86	— 0.15	71	4.033	73.32	+ 0.18
23	2.710	74.02	+ 0.88	72	4.759	73.00	— 0.14
24	2.790	72.04	— 1.10	73	3.347	72.96	— 0.18
25	2.889	72.55	— 0.59	74	4.745	72.96	— 0.18
26	3.267	72.91	— 0.23	75	5.403	73.07	— 0.07
27	4.005	72.58	— 0.56	76	5.711	72.89	— 0.25
28	3.573	72.66	— 0.48	77	5.373	72.99	— 0.15
29	2.409	73.18	+ 0.04	78	4.834	73.05	— 0.09
30	3.857	73.16	+ 0.02	79	4.178	73.19	+ 0.05
31	3.870	72.27	— 0.87	80	5.257	73.29	+ 0.15
32	4.876	72.88	— 0.26	81	4.182	73.00	— 0.14
33	2.607	73.07	— 0.07	82	3.988	73.14	0
34	3.212	72.82	— 0.32	83	6.012	73.19	+ 0.05
35	4.627	72.73	— 0.41	84	4.904	73.12	— 0.02
36	3.708	72.52	— 0.62	85	4.844	73.02	— 0.12
37	2.637	73.19	+ 0.05	86	6.458	73.24	+ 0.10
38	2.576	73.06	— 0.08	87	4.831	73.19	+ 0.05
39	4.110	72.99	— 0.15	88	6.092	72.92	— 0.22
40	2.624	72.71	— 0.33	89	4.667	73.58	+ 0.44
41	4.188	73.14	0	90	3.480	71.78	— 1.36
42	3.388	73.14	0	91	3.213	70.68	— 2.46
43	3.382	73.03	— 0.11	92	4.155	72.15	— 0.99
44	3.819	73.32	+ 0.18	93	2.662	72.26	— 0.88
45	4.044	72.95	— 0.19	94	4.410	66.37	— 6.77
46	3.130	73.16	+ 0.02	95	3.457	73.27	+ 0.13
47	2.404	73.17	+ 0.03	96	3.401	66.66	— 6.48
48	2.384	73.41	+ 0.27	97	3.045	72.61	— 0.53
49	2.504	73.32	+ 0.18	98	3.299	67.08	— 5.96

Table IV. Analytical results obtained with the silver wool heated at various temperatures

Determination of	Sample	T° C	Sample (mg)	Found (%)	Deviation (%)
Chlorine	*B*	550	5.366	73.15	+ 0.01
			3.864	73.16	+ 0.02
			3.826	73.26	+ 0.12
			4.510	72.88	— 0.26
			5.072	73.01	— 0.13
			7.229	73.04	— 0.10
			5.593	72.89	— 0.25
Chlorine	*B*	500	4.337	73.14	0
			4.077	73.29	+ 0.15
			4.203	72.88	— 0.26
			6.469	73.26	+ 0.12
Chlorine	*B*	470	5.920	73.01	— 0.13
			5.276	73.10	— 0.04
			3.031	72.88	— 0.26
			3.009	73.21	+ 0.07
			3.244	73.06	— 0.08
			4.644	73.24	+ 0.14
Chlorine	*B*	430	4.853	73.09	— 0.05
			6.487	73.22	+ 0.08
			5.887	73.16	+ 0.02
Chlorine	*B*	350	5.514	73.21	+ 0.07
			6.507	73.12	— 0.02
			5.540	73.14	0
			5.280	72.97	— 0.17
			4.779	72.86	— 0.28
			4.133	73.22	+ 0.08
Chlorine	*B*	300	4.493	65.94	— 7.20
			6.211	53.92	— 19.22
			6.930	70.14	— 3.00
			5.626	70.87	— 2.27
			5.022	62.25	— 10.89
			5.310	61.94	— 11.20
			5.060	51.80	— 21.34
Chlorine	*B*	250	4.465	49.16	— 23.98
			5.135	51.61	— 21.53
			4.545	47.57	— 25.57
			6.911	58.69	— 14.45
Bromine	*C*	550	4.449	85.28	— 0.71
			3.165	86.13	+ 0.41
			4.805	86.06	+ 0.07
			6.555	85.69	— 0.30
			3.970	85.84	— 0.15

(Continued on the following page)

(Continued from the previous page)

Determination of	Sample	T° C	Sample (mg)	Found (%)	Deviation %
Bromine	*C*	550	3.815	85.74	— 0.25
			5.219	86.05	+ 0.06
			3.646	85.93	— 0.06
			5.578	85.99	0
			2.547	85.56	— 0.43
			4.253	85.92	— 0.07
Bromine	*C*	435	5.689	85.83	— 0.16
			5.420	85.83	— 0.16
			5.644	85.84	— 0.15
			5.270	85.84	— 0.15
			5.301	86.00	+ 0.01
Bromine	*C*	290	4.248	85.73	— 0.26
			4.891	86.06	+ 0.07
			5.094	85.92	— 0.07
			4.977	86.16	+ 0.17
			5.910	85.99	0
Bromine	*C*	250	6.427	85.84	— 0.15
			4.112	85.87	— 0.12
			6.872	85.87	— 0.12
Bromine	*C*	185	5.073	85.89	— 0.10
			4.292	85.86	— 0.13
Bromine	*C*	120	4.484	86.06	+ 0.07
			5.326	85.79	— 0.20
Bromine	*C*	90	5.766	86.18	+ 0.19
			5.383	86.03	+ 0.04
			7.394	85.83	— 0.16
			5.609	85.83	— 0.16
Bromine	*C*	60	5.609	85.99	0
			6.065	85.70	— 0.29
Iodine	*D*	510	7.003	96.60	— 0.10
			3.833	96.66	— 0.04
			7.845	96.63	— 0.07
			8.137	96.65	— 0.05
			5.411	96.64	— 0.06
			7.384	96.74	+ 0.04
			6.132	96.67	— 0.03
			3.922	96.58	— 0.12
			4.022	96.72	+ 0.02
			4.375	96.71	+ 0.01
Iodine	*D*	435	3.510	96.67	— 0.03
			3.950	96.51	— 0.11
			6.371	96.88	+ 0.18

(Continued on the following page)

(Continued from the previous page)

Determination of	Sample	T° C	Sample (mg)	Found (%)	Deviation (%)
			6.180	96.57	— 0.13
			5.850	96.79	+ 0.09
			6.175	96.52	— 0.18
			4.002	96.95	+ 0.25
			5.416	96.64	— 0.06
			3.628	96.72	+ 0.02
			5.114	96.87	+ 0.17
			6.129	96.79	+ 0.09
Iodine	*D*	250	5.650	96.59	— 0.16
			5.025	96.86	+ 0.16
			3.178	96.51	— 0.19
			3.683	96.42	— 0.28
			6.047	96.30	— 0.40
			4.668	96.72	+ 0.02
			8.045	96.68	— 0.02
			5.611	96.74	+ 0.04
			4.952	96.53	— 0.17
			6.413	96.59	— 0.11
			6.113	96.70	0
			5.264	96.60	— 0.10

Sample *B*: α-Benzene hexachloride; Sample *C*: Benzene hexabromide (Br% = 85.99); Sample *D*: Iodoform (I% = 96.70); T° C: The temperature at which the absorbent was maintained; Deviation: Found(%)-Theory(%).

Effect of flow-rates of oxygen and air on the analytical results for chlorine: To decide suitable flow-rates of oxygen and air, a number of determinations of chlorine were carried out using different flow-rates. The experimental conditions and statistical calculation of the results are shown in Table II. All the values obtained in the series of the analyses are shown in Table III. These results indicate that 10–15 ml per minute as flow-rates for both oxygen and air are suitable. Even in the cases of bromine, iodine and sulphur, satisfactory results were obtained using such flow-rates.

Temperature of the absorbent: It is important to establish the permissible range of temperature over which absorption is complete. Experiments were carried out with the absorbent maintained at various temperatures. In all of these the rates at which oxygen and air were passed through the absorption-funnel were each maintained at 10 ml per minute.

The analytical results obtained are given in Table IV and show that absorption is satisfactory from a temperature higher than the melting point of the silverhalide (AgCl: 450°; AgBr: 419°; AgI: 552°) to a tem-

perature lower than the minimum used with silver gauze by *Stragand* and *Safford*. The wide operating temperature range of electrolytic silver wool is one of the advantages of the method.

It was interesting that bromine was absorbed at a temperature as low as 60° C, as is illustrated in Fig. 4; but in this case the capacity of the absorbent was very low, and only one determination could be carried out by an absorption-funnel containing about 0.4 g of the absorbent.

Table V. Analytical results obtained by the silver gauze method

Sample	Sample (mg)	Found (%)	Deviation (%)
F	5.118	32.00	— 0.08
	7.412	31.80	— 0.28
	6.195	32.42	+ 0.34
	4.359	31.88	— 0.20
	6.166	31.94	— 0.14
	6.095	31.76	— 0.32
	5.934	31.74	— 0.34
	6.755	31.55	— 0.53
	3.109	31.09	— 0.99
	4.247	32.25	+ 0.17
	7.362	31.76	— 0.32
	6.307	31.66	— 0.42
	6.643	31.64	— 0.44
	3.965	31.60	— 0.43
	3.935	31.64	— 0.44
	7.526	31.69	— 0.39
	8.583	30.98	— 1.10
	4.297	31.83	— 0.25
	4.080	32.03	— 0.05
	5.576	31.65	— 0.43
	4.230	31.93	— 0.15
B	5.725	71.51	— 1.63
	7.589	72.57	— 0.57
	7.730	72.68	— 0.46
	4.061	72.79	— 0.35
	6.008	72.85	— 0.29
	7.297	72.55	— 0.59

Sample *F*: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (Cl% = 32.08); Sample *B*: α-Benzene hexachloride (Cl% = 73.14).

To sum up the absorbent appears to absorb halogens quantitatively over an operating temperature range of 250 to 550° and 350–450° is recommended as a suitable range for general use. The existence of this wide range suggests the possibility of a simultaneous determination of a halogen and sulphur.

Comparison with other methods: Stragand-Safford's method was tested with two substances containing chlorine. The results obtained were not precise with either 2,4-dichlorophenoxy acetic acid or α-benzenehexa-chloride, as illustrated in Table V. In the case of the latter escaping chlorine was detected after only two or three determinations with a roll of silver-gauze. Since the silver-gauze has such a short life and the results are not precise enough, it is concluded that the method of *Stragand-Safford* is unsuitable for routine use.

Steyermark et al.[8,9] have summarized the analytical results obtained by the *Carius*, *Pregl* and *Parr*-bomb methods. The precision of the

absorption-funnel method presented here compares favourably with that of the *Carius* or *Pregl* methods, and in addition the procedure is much simpler.

Summary

Safford and *Stragand* have described a method for the microdetermination of halogens using a silver-gauze-absorbent. The procedure is very simple, but unfortunately the results are not precise enough to enable the method to be recommended.

The method has been modified. The sample is burned in an atmosphere of oxygen using a platinum catalyst, and the halogen formed is quantitatively absorbed on electrolytic silver wool in a special absorption-funnel, which is then weighed. The method is precise and accurate (standard deviation of the results: 0.12 per cent). Silver wool presents a much greater surface than silver-gauze and absorbs on an average 160 mg of chlorine per gram, i. e. forty or fifty times as much as a piece of silver-gauze of the same dimensions. The charge in an absorption-funnel therefore has a long life for routine analysis of halogen compounds. The operating temperature range of the silver-wool is wide, so that precise control is not neccessary. The method compares favourably in accuracy, precision and simplicity with established methods.

Zusammenfassung

Safford und *Stragand* veröffentlichten eine Methode zur Mikro-Halogenbestimmung mit Hilfe eines Silberdrahtnetzes als Absorptionsmittel. Dieses Verfahren ist sehr einfach, aber seine Resultate leider nicht genau genug, um es zu empfehlen. Die Methode wurde daher modifiziert. Die Substanz wird in einer Sauerstoff-Atmosphäre über einem Platinkontakt verbrannt, das Halogen quantitativ in einem besonderen Absorptionsröhrchen über elektrolytischer Silberwolle absorbiert und dann gewogen. Diese Methode ist genau und verläßlich (mittlere Abweichung der Resultate: 0,12%). Silberwolle bietet eine viel größere Oberfläche als Silberdrahtgeflecht und absorbiert durchschnittlich 160 mg Chlor pro Gramm, das heißt 40- bis 50mal mehr als Silberdrahtgeflecht gleichen Ausmaßes. Die Füllung eines Absorptionsröhrchens reicht daher für viele Serienanalysen von Halogenverbindungen. Das geeignete Temperaturbereich für Silberwolle ist groß, eine genaue Kontrolle daher nicht nötig. Die Genauigkeit und Einfachheit der Methode ist auch im Vergleich mit bekannten Analysenverfahren durchaus zufriedenstellend.

Résumé

Safford et *Stragand* ont décrit une méthode de microdosage des halogènes par fixation sur toile d'argent. La technique en est très simple mais elle ne permet pas d'obtenir des résultats de précision suffisante. Elle a été modifiée par les auteurs.

La prise d'essai est brûlée en atmosphère d'oxygène en présence d'un catalyseur de platine et les halogènes formés sont quantitativement fixés sur de la laine d'argent électrolytique dans un tube d'absorption spécial qui

est ensuite pesé. La méthode est précise et exacte (l'écart type des résultats est égal à 0,12 pour cent). La laine d'argent présente une surface beaucoup plus élevée que la toile d'argent et fixe en moyenne environ 160 mg de chlore par gramme, soit, pour le même encombrement, quarante à cinquante fois plus que la toile d'argent. Il en résulte une longue durée de la charge du tube d'absorption lors d'analyses en série des composés halogénés. La température de la laine d'argent peut varier dans un large domaine de sorte qu'il n'est pas nécessaire d'en assurer une régulation précise. La méthode se compare favorablement aux méthodes classiques quant à son exactitude, sa précision et sa simplicité.

References

[1] *T. Mitsui*, Review Yukikagaku no shimpo (Progress in Organic Chemistry). Vol. X. Tokyo: Kyoritsu. 1955.

[2] *H. W. Safford* and *G. L. Stragand*, Analyt. Chemistry **23**, 520 (1951).

[3] *T. Kōno*, *K. Sato*, *M. Suzuki* and *I. Isobe*, J. Agr. Chem. Soc. Japan **29**, 560 (1955).

[4] *T. Mitsui*, Kagaku no Ryoiki **5**, 687 (1951).

[5] *T. Mitsui*, Bull. Res. Inst. Food Science, Kyoto Univ. **17**, 20 (1955).

[6] *T. Mitsui*, Japan Analyst **1**, 130 (1952).

[7] *W. MacNevin*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **10**, 341 (1938).

[8] *Al Steyermark* and *M. B. Faulkner*, J. Ass. Off. Agric. Chem. **35**, 291 (1952).

[9] *Al Steyermark* and *M. V. Garner*, J. Ass. Off. Agric. Chem. **36**, 319 (1953).

Institute of Medical Chemistry, University of Uppsala, Uppsala, Sweden

Exchange Spectrophotometry I.

By

Wolfgang J. Kirsten

With 1 Figure

(Received April 27, 1956)

Spectrophotometry is one of the most accurate and sensitive tools for micro- and ultramicroanalysis. For a number of elements or groups such as chloride, bromide, fluoride, sulphide, sulphate etc., it has been difficult to find good direct spectrophotometric methods. Indirect spectrophotometric methods have been devised, but these are often not very practical because of their small range, and because of the fact that the very small amounts involved are obtained as the difference between the measurements of two large values, making the result less accurate.

There is, however, a way to devise semi-direct spectrophotometric methods by using the following type of reaction, which has previously been very little used for spectrophotometric purposes:

If A is the ion or other compound to be determined, and A forms a slightly dissociated or insoluble salt or complex AB with B, and B in its turn forms a slightly dissociated or insoluble complex BC with C the reaction

$$A + BC = AB + C \qquad (1)$$

may take place. If C absorbs light the liberated amount of C, which is equivalent to A, can be measured.

In order that a reaction of this type should be suitable for the spectrophotometric determination of A the following conditions are necessary:

1. Both AB and BC must be very slightly dissociated or very slightly soluble.

2. The dissociation or solubility of BC must be much higher than that of AB.

3. The excess of BC used in the reaction must not interfere with the measurement of C, or it must be possible to remove this excess or to separate C from the reaction mixture before the measurement.

At first sight it might appear that these conditions are so specialised that hardly any reaction at all could be expected to fulfill them. As far as the author knows, only very few such reactions have hitherto been used[1–4], and in several of these cases the methods developed are not very satisfactory because the conditions outlined above are fulfilled only partially.

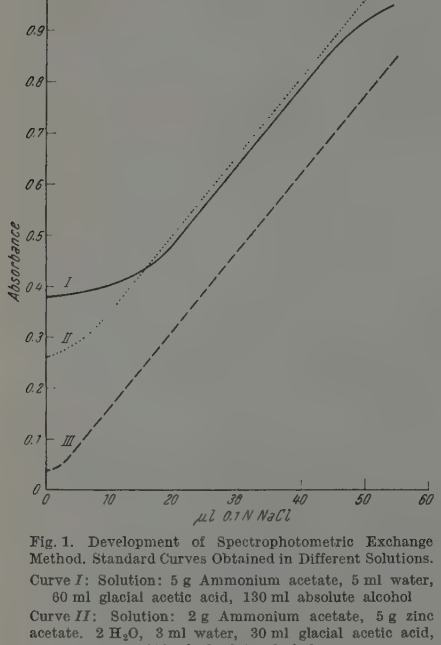

Fig. 1. Development of Spectrophotometric Exchange Method. Standard Curves Obtained in Different Solutions.
Curve *I*: Solution: 5 g Ammonium acetate, 5 ml water, 60 ml glacial acetic acid, 130 ml absolute alcohol
Curve *II*: Solution: 2 g Ammonium acetate, 5 g zinc acetate. 2 H_2O, 3 ml water, 30 ml glacial acetic acid, 160 ml absolute alcohol
Curve *III*: Solution: 0,5 g Ammonium acetate, 2 g zinc acetate. 2 H_2O, 5 ml water, 5 ml glacial acetic acid, 180 ml absolute alcohol, 100 ml ethyl acetate

However, if we consider the possibilities opened up by the use of nonaqueous solvents or mixtures of water with organic solvents, by the adjustment of p_H with suitable buffers, and by the use of organic reagents, we find that the range of possible reactions can be considerably extended.

A typical absorption curve corresponding to the reaction (1) is given in Fig. 1, curve *I*. The reaction used is that between chloride, *A*, and the solid silver-1,2,3-benzotriazole compound, *BC*, in a water-alcohol-acetic acid solution. The liberated 1,2,3-benzotriazole, *C*, was measured. Near the origin the measured absorbancy of *C* is mainly determined by the solubility product of *BC*. As the amount of free *C* in the solution increases because of reaction (1) the solubility of *BC* is depressed, and the curve becomes a straight line. In this region the amount of *C* present in the solution, apart from the blank, is equivalent to the amount of *A* used in the reaction. When the amount of free *C* in the solution increases further, *C*, being the product of reaction (1), opposes this reaction. The latter is no longer quantitative and a convex curve is obtained.

In order to make the reaction as useful as possible for accurate analysis the curve should be straight. The convex part becomes straight if

reaction (1) is quantitative. This can be achieved by increasing the difference in dissociation or solubility between AB and BC. Frequently these properties of the two compounds are influenced in different directions or to different degrees by changing the p_H or the content of organic solvent of the medium used for the reaction. Hence by changing these conditions a better curve may be obtained. Another possibility is to remove the liberated C from the solution by shaking it out with another solvent. As C frequently is a complexing agent it may also be possible to inactivate the excess of it by adding another ion which forms a more dissociated complex with C. In the present case zinc was used to inactivate the excess of 1,2,3-benzotriazole formed. The zinc-benzotriazole complex is more dissociated and soluble in the solution used, and it does not interfere with the measurement. Curve *II* in Fig. 1 was thus obtained.

The concavity in the curve near the origin is caused by the solubility of BC, and therefore this solubility should be decreased. This may be done either by change in the p_H or in the content of organic solvent in the solution. It should be noted that the solubility of AB has also to be depressed in order to allow a quantitative reaction (1).

Curve *III* in Fig. 1 is an example of this procedure. It was obtained by using a solution with a considerable content of alcohol and ethyl acetate. Curve *III* is quite suitable for good spectrophotometry.

Different volumes of 0.1 N sodium chloride in water solution were pipetted into glass-stoppered test tubes, and the volume was made up to 50 μl with water. 10 ml of the respective solutions *I*, *II* or *III* were added. A small amount of solid silver-benzotriazole, ca. 10 mg, was added from a spatula and the mixture was shaken strongly for 1 minute. After centrifuging, 5 ml of the supernatant solution were pipetted into a 25-ml measuring flask, and the volume was made up to the mark with 5 N ammonia. The absorbance was read in a 1-cm cuvette at 274 mμ, using as blank the same mixture without benzotriazole and chloride.

If we consider reactions used in analytical chemistry, it appears that it should be possible to adapt quite a number of them to spectrophotometry. Silver halides and sulfide are very insoluble in organic solvents. Silver dithizonate is soluble in organic solvents. The solubilities of the silver halides and sulphide are only slightly affected by changes in the p_H of the solution, while the stability of the dithizonate decreases considerably with p_H. By properly adjusting the p_H and by choosing suitable organic solvents it is possible to find a medium where the necessary conditions for the reaction are met[5]. Dithizone and other complexing agents can probably be used also for exchange reactions with other metals.

1,2,3-benzotriazole has already earlier been mentioned by the author[6]. It can probably be used for the determination of a number of ions which form slightly soluble or slightly dissociated silver salts.

Cyanide, thiocyanate, oxalate and the great bulk of organic compounds which form slightly dissociated or slightly soluble silver salts or complexes can probably be determined via some silver complex with a light absorbing group.

Barium sulphate is less soluble than barium rhodizonate. Preliminary qualitative tests indicate that sulphate can be determined by measuring the rhodizonic acid liberated from barium rhodizonate in the reaction with sulphate.

Fluoride forms slightly soluble salts or complexes with a number of metals, several of which form complexes with other compounds which should allow colorimetric or spectrophotometric measurement[3].

A number of reactions are under investigation and will be treated in subsequent papers in this series.

Acknowledgment

The author is indebted to *Einar Stenhagen* for his interest in the work. The study is made possible by a grant from the University of Uppsala, Faculty of Medicine.

Summary

The possibility of adapting exchange reactions for spectrophotometric determinations is discussed, and approaches to such methods are outlined. Some examples are given. The compound silver-1,2,3-benzotriazole is suitable for the determination of halides.

Zusammenfassung

Die Möglichkeit der Verwendung von Austauschreaktionen für spektrophotometrische Analysen wird erörtert und deren Ausarbeitung an Hand einiger Beispiele umrissen. Die Silber-1,2,3-benzotriazolverbindung eignet sich für die Bestimmung von Halogeniden.

Résumé

Discussion de la possibilité d'adaptation des réactions d'échange aux déterminations spectrophotométriques. Possibilités de mise en oeuvre de ces méthodes. Exemples. Le composé argent-1,2,3-benzotriazol convient au dosage des halogénures.

Literature Cited

[1] Lumetron Photoelectric Colorimeter. Photovolt Corporation, New York, p. 579.

[2] *F. D. Snell* and *C. T. Snell*, Colorimetric Methods of Analysis, Vol. II, 3rd Ed., pp. 715, 769.

[3] *J. L. Lambert*, Analyt. Chemistry **26**, 558 (1954).

[4] *J. L. Lambert* and *St. K. Yasuda*, Analyt. Chemistry **27**, 444 (1955).

[5] *W. J. Kirsten*, Mikrochim. Acta [Wien] **1955**, 1087.

[6] *W. J. Kirsten*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 836.

Département de Microchimie de l'Université Libre de Bruxelles

Ultra micro méthode de dosage direct du cuivre chromatographié sur papier

Par

A. Lacourt et P. Heyndryckx

Avec 10 Figures

(Reçu le 30 avril 1956)

Les réactions de complexion des éléments, exploitées fructueusement en vue de la sensibilisation de leur détection sont susceptibles de se réaliser sur papier. *F. Feigl*[1] a même démontré, que la dispersion des particules de complexe à la surface du papier a pour effet d'augmenter la sensibilité visuelle de certaines de ces réactions. Il est devenu actuellement intéressant à divers points de vues de pouvoir *doser directement sur papier*, de très petites quantités de matière. La chromatographie sur papier et l'électrophorèse ayant pris un développement sérieux, visent à l'analyse quantitative rapide de milieux vivants où précisément des traces infinitésimales d'éléments ou de substances biogènes jouent un rôle prédominant.

Doser directement, sur le papier, les taches de ces éléments que ces techniques ont isolés, — toujours en quantités de l'ordre du microgramme ou inférieures, — est un problème dont la solution a été désirée depuis l'apparition de ces méthodes d'ultra microanalyse sur papier.

Les auteurs qui ont abordé la partie quantitative de ce problème, se sont jusqu'ici heurtés à l'inhomogénéité optique, titrimétrique ou autre du papier.

Jusqu'ici, ou bien ils ont dû se contenter d'approximations assez grossières, ou bien ils ont dû se servir de méthodes de dosage spectrophotométriques, après lavage de la tache de l'élément et du papier*.

* Au cours de la rédaction du présent travail *Shukichi Sakuraba* a publié un article sur le microdosage spectrophotometrique du cuivre et du cobalt sur papier[2]. D'après le résumé anglais qui seul nous est parvenu, il s'agit de transmissions de taches de complexe triple de cobalt ou de cuivre avec le

Cette dernière méthode est quasi infaillible et donne d'excellents résultats[3] pour autant que l'on dispose d'assez de matière pour rester au-dessus du seuil de sensibilité de la réaction servant dans le dosage. L'élution et la préparation des liqueurs colorées à doser, les volumes des récipients jaugés et ceux des appareils spectrophotométriques, impliquent toujours une certaine dilution, limitant l'ordre de grandeur des quantités dosables. Par contre, le travail direct sur papier prend les quantités là où elles sont et telles quelles, sans dilution.

Certains dosages polarographiques ont déjà été préconisés ainsi, mais comme il a été dit plus haut, le manque d'homogénéité du papier est tel qu'il en réduit fortement la reproductibilité des résultats.

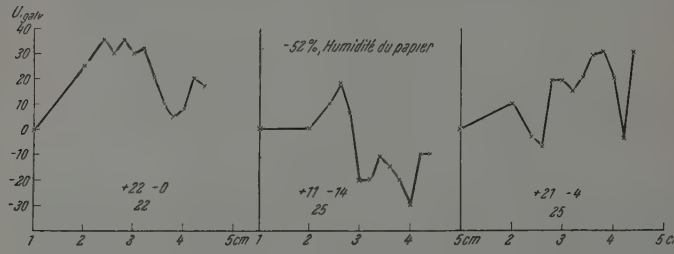

Fig. 1. Manque d'homogénéité photométrique du papier Whatman No 4

Dans certains cas, le problème de l'ultra micro dosage de quantités de l'ordre du microgramme, *directement sur le papier*, a déjà été abordé et résolu par nous avec succès par titrimétrie[4] pour le vanadium, le molybdène, le cobalt, le nickel et les chlorures.

Plus récemment, nous avons publié résolu le problème de la photométrie directe sur papier, du cobalt et du vanadium, ainsi que celle du phosphore[5].

Au cours de ces mises au point, le manque d'homogénéité du papier a plus ou moins pu être éliminé, lorsque la tache d'élément à doser s'est trouvée là où elle avait été déposée[6] (Fig. 1). Ceci est un cas assez rare et limite le domaine d'application de la méthode photométrique.

Par contre, lorsqu'il s'agit de taches d'élément ayant migré plus loin que le dépôt, la qualité (titrimétrique ou optique) du papier d'un endroit à un autre intervient à nouveau, parce que la correction due au blanc papier ne peut être préalablement fixée avec précision, pour l'endroit

sulfocyanure de zinc et de mercure — formées sur papier. L'auteur se plaint du manque d'homogénéité du papier. L'erreur moyenne du dosage est de 2,3% pour le Cu, 3,1% pour le Co — pour des quantités comprises entre 0,1 et 1 μg contenues dans une prise de 0,020 ml.

exact où se formera la tache à doser. L'erreur est d'autant plus grande, que la chromatographie et l'électrophorèse changent la qualité (titrimétrique et optique) du papier par suite du passage des solvants ou des électrolytes. C'est ainsi, qu'un blanc papier non chromatographié représente $\pm$ 0,100 unité de densité optique, alors qu'il n'en représente que 0,010 lorsqu' il est chromatographié. Cependant, il est apparu que la *mesure globale* de la transmission du papier filtre, immergé dans des conditions standard dans la cuvette du Beckman lève ces difficultés dues à l'inhomogénéité optique du papier, et fournit des moyennes utilisables aux fins que nous poursuivons.

Des bandelettes de papier différentes, ou des portions d'une même bandelette absorbent globalement la lumière — dans les conditions où nous avons travaillé — d'une façon assez reproductible pour qu'on puisse déterminer une valeur moyenne de blanc exprimable en unités de densité optique et dont on puisse tenir compte dans un ultra microdosage.

Lorsque la tache dosée résulte d'une complexion créant une coloration il faut produire celle-ci par vaporisation de la tache sur le papier, à l'aide d'un réactif adéquat. La surface du papier se chargeant de ce réactif, absorbe alors la lumière d'une façon différente de celle du papier filtre blanc. Pour connaître la valeur optique de la tache de complexe formée sur le papier, il convient donc de tenir compte, non pas de l'absorption du papier blanc, mais de celle du papier vaporisé avec un réactif d'une manière standard. Ceci donne lieu à la mesure d'un *blanc réactif standard*, qui n'est autre, qu'une bandelette de papier filtre vaporisée avec du réactif révélateur dans des conditions standard.

Par spectrophotométrie, ces valeurs sont très reproductibles.

Cette mise au point délicate a été faite avec succès pour arriver à doser des taches chromatographiées de sels de cuivre, sur papier, dans les limites de 0,1 à 10 μg d'élément.

On sait d'après le tableau d'analyse qualitative chromatographique dressé par *F. H. Pollard* et *J. W. McOmie* que le cuivre est un élément qui migre dans toutes les conditions de développement[7].

La méthode spectrophotométrique directe de dosage des taches de cuivre, mise au point dans le présent travail, permettra donc pour la *première fois*, de doser cet élément *chromatographié* avec rigueur, sur papier, à l'échelle du microgramme. On peut avec raison être surpris de la précision qui est atteinte dans ce dosage; elle varie de 1,08 à 0,09%.

Cette dernière technique ne se limite pas au microdosage du cuivre, elle est applicable à celui de tout élément dont la tache migre par chromatographie. Dans cet ordre d'idée, nous l'avons déjà appliqué au cas très difficile du zinc. Il est bien entendu que ceci n'exclue pas l'emploi de cette technique pour le dosage d'éléments dont la tache reste au dépôt, ou pour l'analyse de gouttes de solutions non chromatographiées.

Nous attirons toutefois l'attention sur le fait observé au cours de toutes nos recherches et selon lequel, la *reproductibilité des résultats des dosages est toujours améliorée (quelle que soit la technique de dosage employée) si on passe par une phase chromatographique*[8].

Le tableau suivant rend compte pour le cuivre en particulier, des constatations faites à ce sujet, ainsi que de la reproductibilité des différentes techniques d'ultra microdosage de cet élément, directement sur papier et dont il sera question ici.

Les sels de cuivre étudiés dans ce travail, sont à l'état de chlorure, en solution dans l'acide chlorhydrique 50% *v/v*.

Tableau I. Reproductibilité des resultats des divers dosages du cuivre

Titrimétrie au complexon III M/100

Concentrations étudiées: 10 à 3 μg		
Erreurs % cuivre *en solution*	Erreur % cuivre-*seul*-chromatographié	Erreur % cuivre-*mélange*-chromatographié (Co-Cu-Zn)
2 à 6%	1 à 6,4%	0,4 à 5%

Photométrie en lumière blanche

Concentrations étudiées: 10 à 0,1 μg
Erreur % cuivre-*mélange*-chromatographié (Co-Cu-Zn)
0,5 à 3%

Spectrophotométrie directe sur papier

Concentrations étudiées: 3 à 0,1 μg	
Erreur % cuivre *non chromatographié* sur ruban	Erreur % cuivre *chromatographié* sur ruban
0,5 à 0,8%	0,09 à 1,08%

Nous signalons ici, et nous verrons plus loin, que ces techniques ont une reproductibilité du même ordre lorsqu'il s'agit de déterminer la concentration de solutions de sels de cuivre, déposées sur le papier et *non chromatographiées*. Dans ce cas, la valeur et la réalisation du blanc sont plus simples, puisque le dépôt peut se faire à un endroit bien défini, dont l'opacité est mesurable préalablement. Dans tous les cas, la reproductibilité des résultats est meilleure dans les expériences où la chromatographie constitue la phase préliminaire à la mesure de la concentration. Toutes ces techniques sont comparatives, c'est-à-dire typiquement microchimiques. Les concentrations se déterminent par rapport à un diagramme de référence, tracé dans des conditions standard.

Parmi ces conditions standard, figurent déjà celles de la préparation et du développement chromatographique. Nous nous sommes étendues au cours de la première partie de ce travail[9], sur tous les facteurs d'influence favorables à la meilleure séparation chromatographique quantitative du cobalt, du cuivre et du zinc.

Rappelons brièvement que le *saturant* des cuves chromatographiques est de la *méthyléthylcétone* fraîchement distillée, que le *développant* est également de la méthyléthylcétone mais que celle-ci est placée dans la cuve pendant la saturation de cette dernière pour subir la contamination de l'atmosphère de l'enceinte contenant en outre un *contaminant* qui n'est autre que de la méthyléthylcétone humidifiée.

La chromatographie se fait sur du papier conditionné à 52% d'humidité suivant le procédé décrit précédemment.

Au cours de la présente recherche, des *facteurs d'interférence* déjà entrevus ont été examinés de plus près surtout du point de vue du parti que l'on peut en tirer en vue d'avantager la chromatographie quantitative sur papier. La *concentration* et le *volume de la prise* de solution de sel de cuivre à chromatographier exercent une influence sur la dimension des taches obtenues après chromatographie et révélation. Pour des *variations de concentration de 1 à 10 dans une prise de 0,01 ml* il peut y

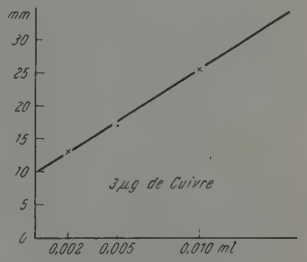

Fig. 2. Effet du volume de prise sur les dimensions des taches de cuivre chromatographié

Tableau II. Effets de la concentration et du volume de prise sur les dimensions des taches de cuivre chromatographiées

Concentration en cuivre		Volume de prise	
Conc. du cuivre en µg dans 0,01 ml	Dimensions des taches en mm et moyennes	Volume de la prise en ml pour 3 µg	Dimensions des taches en mm et moyennes (Fig. 2)
1	23/23/24 *M/3: 23*	0,003	13/14/13 *M/3: 13*
3	25/26/25 *M/3: 25*	0,005	17/18/19 *M/3: 18*
10	28/29/29 *M/3: 29*	0,010	25/26/25 *M/3: 25*

Toutes les expériences sont effectuées avec du chlorure de cuivre ($CuCl_2 \cdot 2\,H_2O$ — 50% acide chlorhydrique *v/v*)

avoir des variations de 20% dans les dimensions des taches chromatographiées. Ceci différencie le cuivre du cobalt[10].

Des *prises différentes en volume*, mais contenant la *même quantité* d'élément, donnent lieu à des taches chromatographiées de dimensions différentes, variant proportionnellement aux volumes des prises (Fig. 2).

Du point de vue qualitatif et aussi du point de vue quantitatif, on pourra donc, en ce qui concerne le cuivre à chromatographier, choisir un volume de prise, *au départ*, qui donne les plus petites taches, de manière à mieux les placer dans un chromatogramme et aussi à mieux les mesurer. *Il sera toutefois nécessaire de chromatographier et de mesurer chaque fois les standard dans les mêmes conditions.*

Du point de vue spectrophotométrique cela n'a aucune répercussion sur le résultat du dosage, tandis que cela peut en avoir photométriquement — l'opacité de la tache par unité de surface influençant le résultat dans cette dernière technique.

L'effet de la concentration de la solution sur les dimensions des taches est désagréable dans le cas de solutions inconnues, si le dosage doit se déterminer par photométrie, non s'il est achevé spectrophotométriquement. La mesure globale de la tache révélée n'est pas influencée par ces facteurs, ce qui ne fait qu'accroître l'intérêt de cette dernière technique.

Mises au point des ultra microdosages directs sur papier

I. Titrimétrie du cuivre sur papier par le complexon III-M/100

Le cuivre en solution se laisse bien titrer par le complexon III[11]. On n'a pas encore étudié ce titrage en présence de papier. Un premier contrôle de la séparation chromatographique quantitative du cuivre a été fait par titrimétrie directe sur papier.

Le *mode opératoire* est très simple et peut être résumé de la façon suivante: à la prise de cuivre provenant d'une solution 50% acide chlorhydrique *v/v* de chlorure de cuivre ($CuCl_2 \cdot 2\,H_2O$) on ajoute:

Réactifs à ajouter	Composition des réactifs
0,25 ml ammoniaque normal	ammoniaque sous cachet Baker ($d = 0{,}90$) 15× normal
5 gouttes de murexide	50 mg de murexide 1/200 chlorure de sodium + 1,5 ml d'ammoniaque 3× normal
5 ml d'eau bidistillée	eau bidistillée

Après addition des réactifs, la solution obtenue est *jaune*, le titrage par le complexon III M/100 la fait virer au *violet*. Ce mode opératoire est celui appliqué *en solution*. Pour titrer le cuivre chromatographié, la prise est remplacée par la bandelette portant le cuivre chromatographié. Cette façon de procéder introduit un élément nouveau dans le titrage, à savoir *le papier*. Pour parer à cet inconvénient, on chromatographie des bandelettes sur lesquelles on a déposé une goutte de *solution de base*, c'est-à-dire, de l'acide chlorhydrique 50% *v/v*. Nous donnons à cette bandelette le nom de «*blanc papier*». La valeur titrimétrique de ce blanc papier est donnée par la différence entre le résultat du titrage de la bandelette portant le cuivre chromatographié et celui de la solution contenant la même quantité de cuivre. Ces valeurs de blanc oscillent autour de $\pm$ 0,004 ml.

La titrimétrie directe sur papier a été étudiée en trois étapes:

1° sur une solution de cuivre;

2° sur du papier portant une prise connue de sel de cuivre chromatographié;

3° sur une bandelette de papier portant une tache de cuivre chromatographiée et séparée d'un mélange.

Les tableaux suivants résument les résultats obtenus par cette titrimétrie.

La concentration en cuivre utilisée pour dresser ces tableaux est de 10 μg par 0,01 ml. Le procédé opératoire a été décrit, ci-dessus. La solution employée pour le titrage est du chlorure de cuivre $CuCl_2 \cdot 2\,H_2O$ 50% acide chlorhydrique *v/v*.

Le titrage du cuivre *en solution* donne des résultats reproductibles avec une erreur ne dépassant pas 5% pour des concentrations variant de 10 à 5 μg de cuivre. Pour 3 μg, les erreurs sont beaucoup plus fortes mais ceci ne doit pas nous étonner parce que le volume de prise n'est plus que de 0,003 ml. En employant une autre dilution de solution, les écarts diminueraient automatiquement.

Après avoir étudié le titrage du cuivre *en solution*, nous passerons au second stade de notre étude en dressant le Tableau IV concernant le cuivre *seul* chromatographié.

La concentration de la solution de cuivre $CuCl_2 \cdot 2\,H_2O$ 50% HCl *v/v* est toujours de 10 μg par 0,010 ml. Le mode opératoire et la façon de procéder à l'estimation du blanc papier ont été donnés, ci-dessus. Ceux-ci oscillent entre les valeurs $\pm$ 0,004 et $\pm$ 0,001 ml de complexon III M/100.

Les valeurs consignées dans ce Tableau IV servent à établir le diagramme de titrage du cuivre par le complexon III M/100 (Fig. 3). Nous voyons que la reproductibilité des résultats est légèrement améliorée par la chromatographie. L'influence du blanc papier se fait sentir égale-

Tableau III. Titrage du cuivre en solution

Prise de cuivre en μg	Complexon III M/100 en ml	Moyenne en ml	Ecart à la moyenne en ml	Ecart en %
10	0,0400/0,0400		— 0,0007/— 0,0007	— 2,0/— 2,0
	0,0395/0,0410		— 0,0012/+ 0,0003	— 3,0/+ 0,9
	0,0415/0,0410	0,0407	+ 0,0008/+ 0,0003	+ 2,0/+ 0,9
	0,0410/0,0405		+ 0,0003/— 0,0002	+ 0,9/— 0,5
	0,0410/0,0410		+ 0,0003/+ 0,0003	+ 0,9/+ 0,9
10	0,0420/0,0410		+ 0,0012/+ 0,0002	+ 3,0/+ 0,5
	0,0405/0,0405		— 0,0003/— 0,0003	— 0,9/— 0,9
	0,0400/0,0410	0,0408	— 0,0008/+ 0,0002	— 2,0/+ 0,5
	0,0410/0,0408		+ 0,0002/—	+ 0,5/—
	0,0408/0,0410		—/+ 0,0002	—/+ 0,5
7	0,0280/0,0290		— 0,0017/— 0,0007	— 6,0/— 2,4
	0,0300/0,0295		+ 0,0003/— 0,0002	+ 1,0/— 0,7
	0,0300/0,0310	0,0297	+ 0,0003/+ 0,0013	+ 1,0/+ 4,3
	0,0295/0,0295		— 0,0002/— 0,0002	— 0,7/— 0,7
	0,0300/0,0300		+ 0,0003/+ 0,0003	+ 1,0/+ 1,0
5	0,0200/0,0210		—/+ 0,0010	—/+ 5,0
	0,0190/0,0195		— 0,0010/— 0,0005	— 5,0/— 2,5
	0,0200/0,0190	0,0200	—/— 0,0010	—/— 5,0
	0,0200/0,0210		—/+ 0,0010	—/+ 5,0
	0,0200/0,0195		—/— 0,0005	—/— 2,5
3	0,0100/0,0105		— 0,0012/— 0,0007	— 12,0/— 7,0
	0,0110/0,0110		— 0,0002/— 0,0002	— 2,0/— 2,0
	0,0105/0,0115	0,0112	— 0,0007/+ 0,0003	— 7,0/+ 3,0
	0,0120/0,0120		+ 0,0008/+ 0,0008	+ 8,0/+ 8,0
	0,0115/0,0120		+ 0,0003/+ 0,0008	+ 3,0/+ 8,0

Tableau IV. Titrage du cuivre seul chromatographié

Prise de cuivre en μg	Complexon III M/100 en ml	Moyenne en ml	Ecart à la moyenne en ml	Ecart en %
10	0,0439/0,0449		— 0,0004/+ 0,0006	— 0,9/+ 1,3
	0,0434/0,0444	0,0443	— 0,0009/+ 0,0001	— 2,0/+ 0,2
	0,0449		+ 0,0006	+ 1,3
7	0,0305/0,0295		+ 0,0007/— 0,0003	+ 2,3/— 1,0
	0,0304/0,0290	0,0298	+ 0,0006/— 0,0008	+ 2,0/— 2,6
	0,0295		— 0,0003	— 1,0
5	0,0210/0,0205	0,0216	— 0,0006/— 0,0011	— 3,0/— 5,7
	0,0220/0,0230		+ 0,0004/+ 0,0014	+ 2,0/+ 6,0
3	0,0127/0,0117		+ 0,0003/— 0,0007	+ 2,4/— 5,6
	0,0117/0,0132	0,0124	— 0,0007/+ 0,0008	— 5,6/+ 6,4
	0,0127		+ 0,0003	+ 2,4

ment dans le sens d'une exhaltation des valeurs de titrage. Elle est assez irrégulière et ne semble pas influencée par le volume de prise puisqu'elle est d'environ 9% pour 10 μg, 0,5% pour 7 μg, 0,8% pour 5 μg et 12% pour 3 μg de cuivre soit pour des volumes de 0,010; 0,007; 0,005 et 0,003 ml.

Pour vérifier le fait que le cobalt et le zinc n'interfèrent pas dans le titrage ou encore que la séparation est quantitative, nous étudierons maintenant le titrage du cuivre chromatographié à partir d'un mélange de chlorures de cobalt, de cuivre et de zinc en solution 50% acide chlorhydrique *v/v* ($CoCl_2 \cdot 6\,H_2O$ — $CuCl_2 \cdot 2\,H_2O$ — $ZnCl_2$).

Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles décrites au Tableau IV. La solution de mélange de chlorures de cobalt, cuivre et zinc est de concentration 10 μg par 0,01 ml. La valeur des blancs reste la même que précédemment.

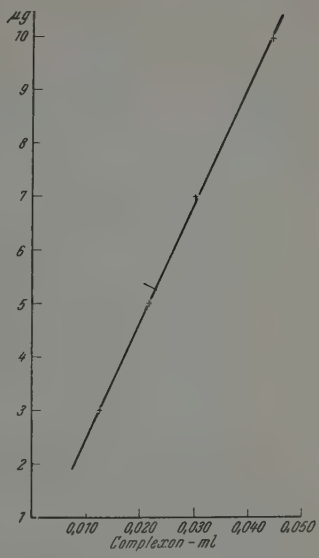

Fig. 3. Titrage du cuivre chromatographié par le complexon, 0,01-m. Indicateur: murexide; concentration: 10 μg/0,01 ml $CuCl_2 \cdot 2\,H_2O$ 50% *v/v* HCl

Ces trois tableaux montrent que les erreurs deviennent assez fortes pour des concentrations en cuivre approchant de 3 μg, les erreurs dues au prélèvement ne semblent donc

Tableau V. Titrage du cuivre chromatographié d'un mélange

Prise de cuivre en μg	Complexon III M/100 en ml	Moyenne en ml	Ecart à la moyenne en ml	Ecart en %
10	0,0448/0,0453		+ 0,0002/+ 0,0007	+ 0,4/+ 1,5
	0,0443/0,0448	0,0446	— 0,0003/+ 0,0002	— 0,6/+ 0,4
	0,0438		— 0,0006	— 1,2
7	0,0312/0,0297		+ 0,0012/— 0,0003	+ 4,0/— 1,0
	0,0292/0,0302	0,0300	— 0,0008/+ 0,0002	— 2,5/+ 0,7
	0,0297		— 0,0003	— 1,0
5	0,0220/0,0230		— 0,0008/+ 0,0002	— 4,0/+ 1,0
	0,0235/0,0230	0,0228	+ 0,0007/+ 0,0002	+ 3,5/+ 1,0
	0,0225		— 0,0003	— 1,5
3	0,0117/0,0127		— 0,010/—	— 10,0/—
	0,0132/0,0122	0,0127	+ 0,0005/— 0,0005	+ 5,0/— 5,0
	0,0137		+ 0,0010	+ 10,0

plus seules en cause. Il est à supposer que c'est plutôt la méthode de dosage elle-même qui est à la limite et qui ne répond plus à nos exigences. Les réactions *sur papier* étant, en général beaucoup *plus sensibles qu'en solution*[5], nous avons supposé que la photométrie en lumière blanche des taches de complexes colorés de cuivre permettrait d'obtenir des résultats plus précis et, par la même occasion, de descendre dans l'échelle des concentrations.

Le contrôle de la séparation chromatographique pourrait ainsi se faire dans de plus larges limites de concentrations. Le chapitre suivant sera donc consacré à la *photométrie en lumière blanche des taches de cuivre chromatographié* et complexé par la suite.

II. Photométrie en lumière blanche du cuivre chromatographié révélé à l'acide rubéanique acétonique

Appareillage:

Le dispositif expérimental adopté pour effectuer cet ultra microdosage du cuivre est, à peu de choses près, celui qui a été décrit à l'occasion de la photométrie du cobalt chromatographié révélé à l'α-nitroso β-naphtol acétonique[5].

Nous rappellerons donc brièvement que l'appareil utilisé est constitué par une cellule photoélectrique au sélénium placée en face d'une fente de 0,5 mm de large sur 5 cm de long, éclairée par une lampe de 30 bougies. La tache à mesurer défile entre cette fente et la cellule photoélectrique. Un galvanomètre, en relation avec la cellule, réagit au passage de la tache devant celle-ci. Une différence essentielle avec la photométrie du cobalt en lumière blanche réside dans le fait que, pour le cuivre un *filtre jaune* est disposé sur la fente de 0,5 mm alors que, pour le cobalt, aucun filtre n'était employé*.

Les déflections galvanométriques sont reportées sur un graphique et constituent ainsi une surface qui est planimétrée. Ce sont les valeurs de ces surfaces exprimées en mm^2, qui permettent d'établir les diagrammes de référence de la photométrie du cuivre en fonction des concentrations en élément étudié.

Mode opératoire:

La photométrie en lumière blanche servant *de méthode de contrôle* de la séparation chromatographique cobalt-cuivre-zinc, nous avons tenté de transformer notre procédé de dosage pour qu'il serve à déterminer les concentrations les plus faibles auxquelles la séparation des trois

* Ce filtre n'a pas d'utilité pratique, mais il a été nécessaire de travailler en sa présence, pour permettre à d'autres recherches de progresser avec le même appareillage.

éléments est encore *quantitative*: c'est ce qui explique les variations de concentrations en réactif révélateur et même, les légères modifications de techniques apportées au dosage que nous allons décrire maintenant. La tache d'élément à doser est révélée par l'acide rubéanique et photométrée ensuite.

D'après l'emploi du révélateur (acide rubéanique acétonique) nous envisagerons *trois variantes* dans ce dosage photométrique du cuivre chromatographié et révélé à l'acide rubéanique acétonique (les solutions employées contiennent toujours les trois éléments étudiés, à savoir le cobalt, le cuivre et le zinc. Le cuivre dosé est donc *toujours séparé des deux autres éléments par chromatographie*).

Nous avons vu, à l'occasion de l'étude de la photométrie du cobalt, que les résultats chromatographiés sont plus réguliers[5].

	Méthode I		Méthode II		Méthode III	
	Conc. solution en μg par 0,01 ml	Conc. acide rubéanique en g%	Conc. solution en μg par 0,01 ml	Conc. acide rubéanique en g%	Conc. solution en μg par 0,01 ml	Conc. acide rubéanique en g%
1°	10	*0,50*	1	*0,25*	0,5	*0,25*
2°	1					

	Conc. cuivre en μg	Conc. acide rubéanique en g%	Conc. cuivre en μg	Conc. acide rubéanique en g%	Conc. cuivre en μg	Conc. acétone ammoniacale
1°	3 à 10	*0,50*	0,3 à 0,5	*0,25*	0,1 à 0,4	1% *v/v*
2°	0,5 à 1					

Pour les méthodes I et II, le procédé de révélation à appliquer après chromatographie et dessication est le suivant: les bandelettes sont vaporisées à l'acétone sur *les deux faces*; ensuite elles sont révélées à l'acide rubéanique en solution acétonique (de concentration 0,50 g% pour la première méthode et 0,25 g% pour la seconde méthode). Les bandelettes sont séchées sous la lampe infra rouge pendant 15 minutes puis mesurées au photomètre à lumière blanche. Pour la méthode III, les bandelettes sont vaporisées à l'acétone ammoniacale 1% *v/v*. Dans ce cas, la concentration en acide rubéanique acétonique employé comme révélateur est de 0,25 g% comme pour la méthode II.

Il est à remarquer que, pour le cuivre comme d'ailleurs pour le cobalt[5], seul le dosage de l'élément *chromatographié* a été étudié: ces mesures sont seules reproductibles sans tenir compte d'un «blanc papier», d'ailleurs

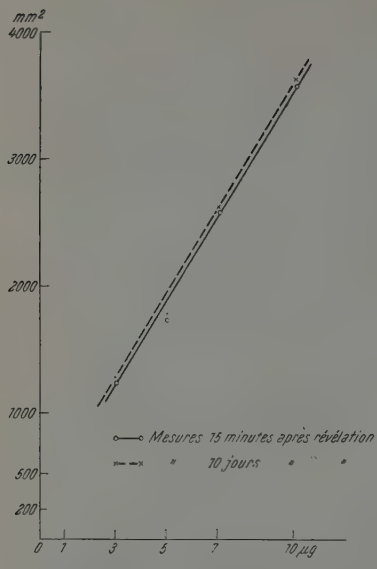

Fig. 4. Diagramme de photométrie du cuivre chromatographié révélé par l'acide rubéanique acétonique (0,5 g%)

impossible à établir ici de façon suffisamment rigoureuse. La chromatographie permettant comme nous l'avons dit bien souvent une meilleure reproductibilité des résultats[8], seules les taches *chromatographiées* ont donné lieu à l'établissement de diagrammes de référence (Tableaux VI, VII, VIII et IX; correspondant aux Fig. 4, 5, 6 et 7).

Le Tableau VI (Fig. 4) donne les valeurs planimétrées pour des concentrations en cuivre de 10 à 3 μg à partir d'une solution de 10 μg par 0,01 ml. A la suite de ce tableau, nous étudierons le vieillissement des taches de cuivre chromatographiées et révélées par l'acide rubéanique (concentration du réactif 0,50 g%) d'après les conditions employées pour établir le Tableau VI. Ce vieillissement est étudié également pour des concentrations variant de 10 à 3 μg de cuivre.

Tableau VI. Etablissement d'un diagramme de référence par la photométrie du cuivre chromatographié, révélé par l'acide rubéanique en solution acétonique de concentration 0,50 g%

	Prise de cuivre en μg Volume de la prise en ml	Surfaces en mm²	Moyenne en mm²	Ecarts à la moyenne en mm²	Ecarts en %
1°	10	3606		+ 22	+ 0,60
		3589	3584	+ 5	+ 0,15
2°	0,01	3557		— 27	— 0,75
1°	7	2621		+ 26	+ 1,00
		2586	2595	— 9	— 0,30
2°	0,007	2580		— 15	— 0,60
1°	5	1738		—	—
		1739	1738	+ 1	+ 0,09
2°	0,005				
1°	3	1244		— 3	— 0,25
		1245	1247	— 2	— 0,15
2°	0,003	1253		+ 6	+ 0,50

Les prises sont faites à partir d'une solution de mélange contenant du cobalt, du cuivre et du zinc à la concentration de 10 μg par 0,01 ml ($CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ — $CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ — $ZnCl_2$ — 50% acide chlorhydrique v/v).

Le cuivre est séparé du cobalt et du zinc par chromatographie suivant le procédé adopté précédemment[9]. Les moyennes obtenues pour les diverses concentrations en cuivre étudiées permettent d'établir le diagramme, Fig. 4.

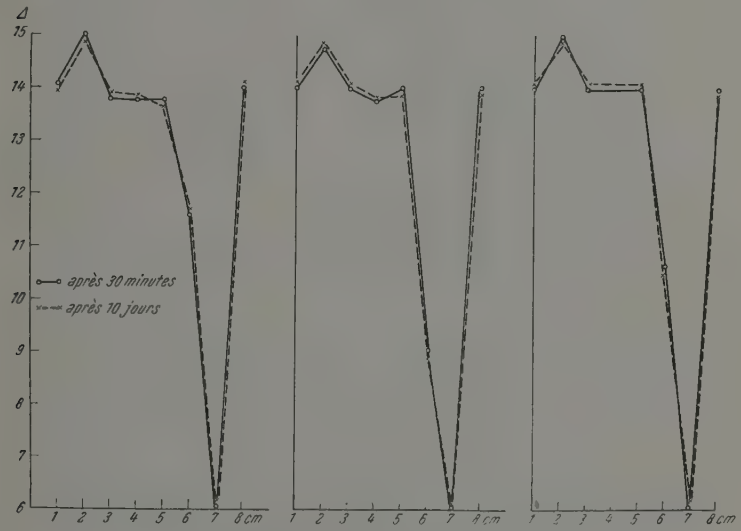

Fig. 5. Photométrie du cuivre révélé par l'acide rubéanique acétonique (3 μg)
(Vieillissement d'une tache sur papier)

Les valeurs obtenues pour la photométrie du cuivre présentent une assez bonne reproductibilité; le diagramme (Fig. 4) est une droite très redressée présentant une irrégularité pour une seule concentration en cuivre, à savoir 5 μg. Il nous a semblé intéressant de nous rendre compte si la tache de cuivre chromatographiée, révélée à l'acide rubéanique acétonique présentait un vieillissement comparable à celui observé pour la révélation cobalt-α-nitroso β-naphtol après une durée de 10 jours. Ces observations feront l'objet du tableau qui va suivre.

Les bandelettes qui ont été remesurées pour établir ce vieillissement sont celles dont les valeurs planimétrées ont été consignées dans le Tableau VI, dans l'ordre adopté pour ce tableau: les valeurs des surfaces sont donc directement comparables et peuvent être reportées sur les Fig. 4 et 5 (tracé en pointillé). Les mesures sont faites *10 jours* après la première évaluation des surfaces planimétrées.

Tableau VII. Etude du vieillissement de la tache de cuivre chromatographiée et révélée par l'acide rubéanique acétonique

	Prise de cuivre en µg Volume de la prise en ml	Surfaces en mm²	Moyenne en mm²	Ecarts à la moyenne en mm²	Ecarts en %
1°	10	3610		+ 23	+ 0,60
		3590	3587	+ 3	+ 0,08
2°	0,01	3560		— 27	— 0,75
1°	7	2625		+ 25	+ 0,90
		2592	2600	— 8	— 0,30
2°	0,007	2585		— 15	— 0,57
1°	5	1741		— 1	— 0,06
		1743	1742	+ 1	+ 0,06
2°	0,005				
1°	3	1246		— 4	— 0,32
		1248	1250	— 2	— 0,16
2°	0,003	1255		+ 5	+ 0,40

L'examen comparatif du Tableau VI et du tableau du vieillissement (VII) des taches n'apporte rien de neuf à l'étude de la photométrie en lumière blanche. La grande similitude des résultats après 10 jours de révélation prouve que les erreurs observées ne peuvent être attribuées

Tableau VIII. Etablissement d'un diagramme de référence par photométrie du cuivre chromatographié, révélé par l'acide rubéanique en solution acétonique de concentration 0,5 g%

	Prise de cuivre en µg Volume de la prise en ml	Surfaces en mm²	Moyenne en mm²	Ecarts à la moyenne en mm²	Ecarts en %
1°	1	1083		— 5	— 0,50
		1093	1088	+ 5	+ 0,50
2°	0,01	1089		+ 1	+ 0,10
1°	0,8	988		— 5	— 0,50
		983	993	— 10	— 1,00
2°	0,008	1008		+ 15	+ 1,50
1°	0,6	895		— 2	— 0,22
		917	897	+ 20	+ 2,20
2°	0,006	880		— 17	— 1,90
1°	0,5	829		— 5	— 0,60
			834		
2°	0,005	839		+ 5	+ 0,60

à la variation du complexe sous l'influence de la lumière: la grande stabilité des mesures est un argument de plus en faveur de ce dosage du cuivre sur papier. Le fait de pouvoir garder un témoin du dosage est précieux dans ce cas puisqu'il nous permet de vérifier la stabilité du complexe cuivre-acide rubéanique formé sur le papier: *après 10 jours les valeurs photométrées du complexe n'augmentent que de 0,2% par rapport au résultat obtenu 15 minutes après révélation.*

Les prises sont faites à partir d'une solution de mélange contenant des chlorures de cobalt, cuivre et zinc ($CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ — $CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ — — $ZnCl_2$ — 50% acide chlorhydrique *v/v*) à la concentration de *1 µg par 0,01 ml.* Le cuivre dosé est séparé au préalable du cobalt et du zinc par chromatographie. Les chiffres

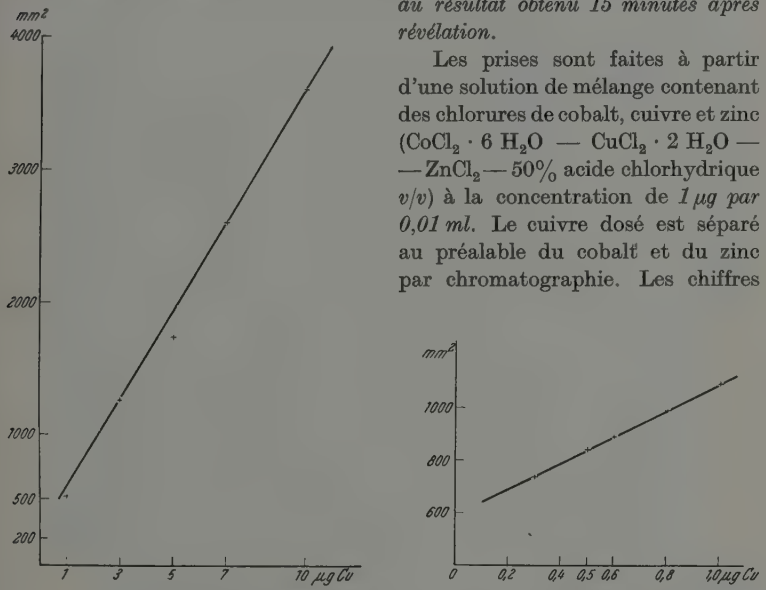

Fig. 6. Photométrie sur papier du cuivre chromatographié
Révélateur: Ac. rubéanique acétonique 0,5 g%
Solution chromatographiée: 50% *v/v* HCl — $CuCl_2$, 2 H_2O — $CoCl_2$, 6 H_2O — $ZnCl_2$

obtenus dans le Tableau VIII permettent de dresser les diagrammes, Fig. 6.

Pour des concentrations en cuivre comprises entre 1 et 0,5 µg, les erreurs pourcent sont encore très favorables à la méthode étudiée: dans les cas les plus défavorables elles n'atteignent que 2% environ mais le plus souvent elles sont de l'ordre de 0,5 à 1%, comme pour les concentrations plus fortes en cuivre, étudiées dans le Tableau VI. Pour éviter des erreurs dues à l'excès de réactif révélateur les essais qui ont été tentés pour des quantités plus faibles en cuivre sont effectués avec une concentration d'acide rubéanique acétonique de *0,25 g%*.

Le Tableau IX et les diagrammes, Fig. 7, rendent compte des résultats obtenus de cette manière. Ultérieurement, la spectrophotométrie sur

papier nous prouvera que cette concentration de révélateur est la plus favorable.

Tableau IX. Etablissement d'un diagramme de référence par photométrie du cuivre chromatographié, révélé par l'acide rubéanique en solution acétonique de concentration 0,25 g%

	Prise de cuivre en μg Volume de la prise en ml	Surfaces en mm²	Moyenne en mm²	Ecarts à la moyenne en mm²	Ecarts en %
1°	0,5	855		— 5	— 0,60
		865	860	+ 5	+ 0,60
2°	0,005	860		—	—
1°	0,4	656		— 23	— 3,0
		685	679	+ 6	+ 1,0
2°	0,004	695		+ 16	+ 2,3
1°	0,3	493		— 9	— 1,8
		499	502	— 3	— 0,6
2°	0,003	515		+ 13	+ 2,6

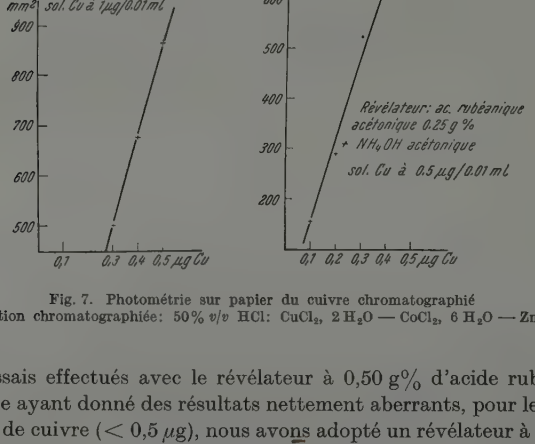

Fig. 7. Photométrie sur papier du cuivre chromatographié
Solution chromatographiée: 50% v/v HCl: $CuCl_2$, $2\,H_2O$ — $CoCl_2$, $6\,H_2O$ — $ZnCl_2$

Les essais effectués avec le révélateur à 0,50 g% d'acide rubéanique acétonique ayant donné des résultats nettement aberrants, pour les faibles quantités de cuivre ($< 0{,}5$ μg), nous avons adopté un révélateur à 0,25 g% pour minimiser les effets possibles d'un excès de ce dernier sur la photométrie du complexe cuivre-acide rubéanique.

La solution employée pour faire les prises est celle dont nous nous sommes servis pour établir le Tableau VIII. Le cuivre est également séparé du cobalt et du zinc par chromatographie comme dans les autres cas étudiés précédemment. Les chiffres constituant les moyennes des résultats et groupés dans le Tableau IX servent à établir les diagrammes, Fig. 7.

La comparaison des valeurs obtenues dans les Tableaux VIII et IX pour la concentration de 0,5 μg de cuivre permet de constater qu'à reproductibilité égale, la concentration en réactif révélateur de 0,25 g% donne des surfaces plus grandes que celles obtenues avec le réactif à la concentration de 0,50 g%. L'accroissement de ces surfaces est de l'ordre de 3% et ne peut qu'être plus favorable à la reproductibilité des mesures pour des concentrations plus faibles en cuivre puisque, de ce fait, nous disposerons d'un plus grand nombre d'unités de surfaces pour ces dernières. Les concentrations inférieures à 0,3 μg de cuivre donnant à leur tour des résultats aberrants nous avons adopté une technique de révélation un peu modifiée pour doser les concentrations inférieures en cuivre: c'est le procédé qui a été décrit comme méthode III de révélation page 1631: il sera adopté par la suite.

Tableau X. Etablissement d'un diagramme de référence par photométrie du cuivre chromatographié, révélé par l'acide rubéanique en solution acétonique de concentration 0,25 g% et en présence d'acétone ammoniacale

	Prise de cuivre en μg Volume de la prise en ml	Surfaces en mm²	Moyenne en mm²	Ecarts à la moyenne en mm²	Ecarts en %
1°	0,4	655	647	+ 8	+ 1,20
2°	0,008	639		— 8	— 1,20
1°	0,3	515	518	— 3	— 0,60
2°	0,006	521		+ 3	+ 0,60
1°	0,2	287	286	+ 1	+ 0,35
		287		+ 1	+ 0,35
2°	0,004	284		— 2	— 0,70
1°	0,1	153	157	— 4	— 2,50
		161		+ 1	+ 2,50
2°	0,002	156		— 1	— 0,70

Welcher[12] préconise l'emploi d'ammoniaque dans le dosage de solution neutre ou faiblement acide de sels de cuivre révélés par l'acide rubéanique. Cette constatation étendue à l'étude du complexe sur papier n'a pas

déçu nos prévisions: le dosage de concentrations de cuivre variant de 0,4 à 0,1 μg peut être réalisé en appliquant la méthode III de révélation décrite page 1631 et employant de l'acétone ammoniacale. Le Tableau X donne les résultats du dosage de ces taches de cuivre dans ces limites de concentrations. Les valeurs des moyennes permettent de tracer le diagramme, Fig. 7.

La reproductibilité des mesures est excellente, compte tenu des faibles concentrations utilisées. De l'ensemble des résultats obtenus par photométrie en lumière blanche, nous pouvons déduire que l'approximation de la méthode est comprise entre 0,5 et 3%. Cette reproductibilité est fort satisfaisante étant donné l'appareil assez rudimentaire et fort peu sélectif qui a été utilisé pour cet ultra microdosage photométrique.

La méthode photométrique de dosage *en lumière blanche* peut être préconisée avec succès dans tous les cas où une réponse rapide est souhaitée. Elle est extrêmement facile à appliquer et ne présente qu'un inconvénient: celui de *ne pouvoir tenir compte d'un blanc papier reproductible et standard.* C'est la raison pour laquelle nous avons envisagé une méthode plus fine de dosage et, par la même occasion plus précise: *la spectrophotométrie directe sur papier au spectrophotomètre Beckman.* Les avantages que peut nous procurer cet appareil sont multiples. En effet, outre le choix *précis* de la longueur d'onde, établi par une étude de la courbe d'absorption du complexe cuivre-acide rubéanique, nous pouvons mesurer une tache *globale* au lieu d'éléments de surfaces qu'il faut reporter sur un graphique puis ensuite planimétrer. Dans le cas de la spectrophotométrie directe sur papier au Beckman, les erreurs graphiques sont éliminées: c'est la réponse de l'appareil lui-même qui est reportée et qui permet d'établir le diagramme de référence.

III. Spectrophotométrie directe sur papier du cuivre non chromatographié et chromatographié, révélé par l'acide rubéanique acétonique

Les techniques décrites précédemment dans ce travail concernent des ultra microdosages du cuivre qui nous ont servi avant tout au contrôle de la séparation chromatographique quantitative du cobalt, du cuivre et du zinc[9]. Elles sont réalisables avec une certaine approximation et peuvent éventuellement servir au dosage de solutions inconnues contenant des ultra micro quantités d'éléments. L'imprécision inhérente à la mesure du blanc papier, limite la reproductibilité et le domaine d'application de ces techniques. Toutes les difficultés dues soit à la mesure du blanc, soit à la migration de l'élément tombent par *spectrophotométrie directe*, comme il a déjà été dit à l'occasion du *cobalt*[10]. *C'est la toute première fois qu'un dosage précis s'appliquant à l'échelle du microgramme est mis au*

point directement sur papier pour déterminer une tache chromatographiée ayant migré.

L'appareillage utilisé sera le même que celui décrit à l'occasion de la spectrophotométrie directe sur papier du cobalt[10]. Rappellons brièvement que nous employons des cuvettes de Beckman de 1 cm munies de pistons calibrés de 9 mm. La bandelette portant la prise de cuivre est placée entre le piston et une des faces intérieures de la cuvette: elle est introduite *à sec*; un liquide aidant à la transmission de la lumière (en l'occurence de l'eau bidistillée) est introduit dès que la tache est bien centrée dans l'ouverture de la fenêtre de la cuvette. Les résultats du dosage sont exprimés en unités de densité optique.

Le procédé de révélation du complexe cuivre-acide rubéanique est le suivant: sur du papier ruban Whatman n° 4 conditionné à 52% d'humidité (condition indispensable à la chromatographie des éléments cobalt-cuivre, comme nous l'avons vu précédemment[9]) une prise de chlorure de cuivre ($CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ — 50% acide chlorhydrique *v/v*) est déposée. Cette dernière est séchée sous infra rouge pendant 15 minutes avant d'être vaporisée sur les *deux* faces par de l'acétone puis par de l'acide rubéanique acétonique (0,25 g%). Après avoir été à nouveau séchée pendant 10 minutes, on la revaporise avec de l'acétone ammoniacale (1% *v/v* d'ammoniaque concentré sous cachet Baker). La bandelette est replacée sous l'infra rouge pendant 10 minutes. Les mesures au spectrophotomètre se font après 15 minutes.

Le zéro de densité optique de l'appareil est fixé sur le «*blanc papier*». Ce dernier est constitué, comme pour le cobalt, par du papier filtre blanc en *ruban*, Whatman n° 4. Il est spectrophotométré en présence d'eau bidistillée. Les conditions de mesure (fente, longueur d'onde) seront établies par l'étude de la *courbe d'absorption du complexe sur papier*. Notons qu'à l'encontre de l'étude consacrée à la spectrophotométrie directe sur papier du cobalt[10] nous n'étudierons pas ici la courbe d'absorption du complexe cuivre-acide rubéanique *en solution*, d'autres que nous ayant déjà abordé ce problème avec succès[13]. De plus, le maximum d'absorption obtenu *en solution* (650 mμ) est très voisin de celui obtenu sur papier pour le complexe du cuivre (660 mμ).

Nous procéderons dans la mise au point du microdosage spectrophotométrique direct sur papier du cuivre dans le même ordre que pour celle du cobalt: à savoir:

Le choix du *maximum d'absorption* du complexe, permettant d'établir les conditions les plus favorables à la mesure;

l'étude du «*blanc papier vaporisé*»;

l'influence de la *concentration* et du *volume de la prise* sur les *dimensions* des taches chromatographiées;

les *diagrammes de référence* du cuivre *non chromatographié* et *chromatographié*.

En ce qui concerne le choix du *maximum d'absorption* du complexe sur papier, il ne nous semble pas utile de donner le détail des chiffres servant à l'établir: les diagrammes dressés grâce à eux sont suffisamment éloquents (Fig. 8 et 9).

Nous avons employé les deux concentrations en réactif révélateur dont nous nous sommes servis à l'occasion de l'étude de la photométrie en lumière blanche du complexe soit *0,50* et *0,25* $g\%$. Les concentrations

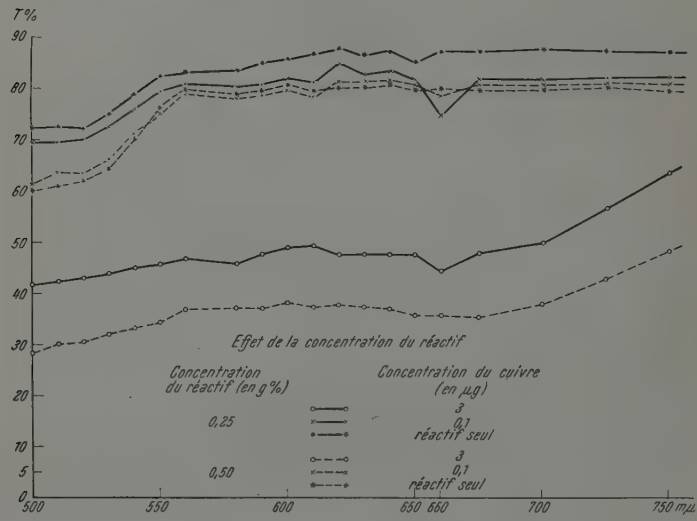

Fig. 8. Recherche du maximum d'absorption du complexe cuivre-acide rubéanique sur papier

3 et 0,1 μg de cuivre ont été utilisées en présence d'un «blanc papier» servant de 100% de transmission. Une mesure de «*blanc réactif*» a été effectuée pour chaque expérience. Le «blanc réactif» est une bandelette de papier blanc vaporisé au réactif révélateur employé dans les conditions établies pour le complexe. Les valeurs de transmissions reportées sur les diagrammes (Fig. 8 et 9), proviennent de la différence de transmission entre la mesure du blanc réactif et celle du complexe elles sont donc bien l'expression exacte de la valeur de transmission optique du complexe cuivre-acide rubéanique *uniquement*.

La concentration en réactif révélateur de 0,25 g% a été adoptée en fin de compte parce que, comme le prouve d'ailleurs le tracé du diagramme (Fig. 8) le maximum d'absorption du complexe est beaucoup plus net

lorsqu'il est établi à l'aide d'un révélateur de concentration plus faible. Pour le cobalt, nous avions établi outre le maximum d'absorption, le longueur d'onde la plus favorable au travail sur papier[10]. Ici, ces deux longueurs d'onde se confondent: le maximum d'absorption (660 mμ) est également la longueur d'onde à laquelle existe la plus grande différence de transmission entre celle du blanc réactif et celle du

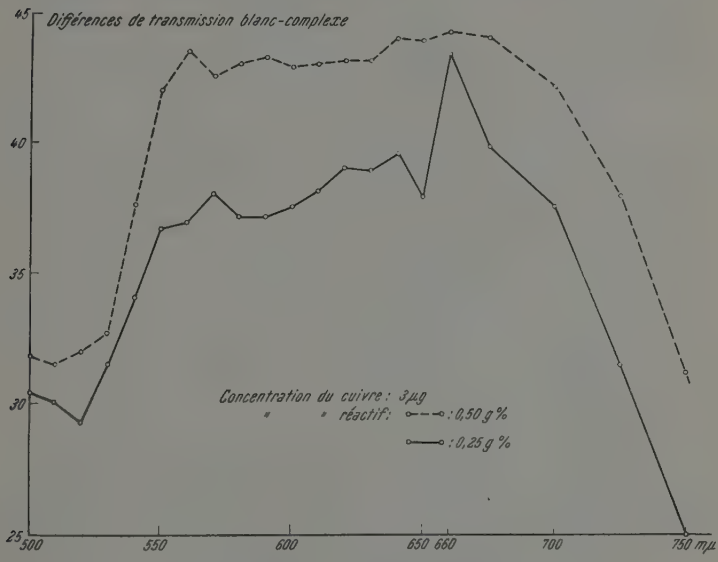

Fig. 9. Différences de transmission blanc-complexe

complexe: elle est par conséquent la plus favorable au travail sur papier (Fig. 9).

Toutes les mesures effectuées par la suite se feront à 660 mμ avec une fente de 0,095 mm et une concentration en acide rubéanique acétonique de 0,25 g%.

Nous avons été amené à établir un «*blanc vaporisé standard*» pour l'étude de la spectrophotométrie directe sur papier du cobalt parce que nous nous sommes rendu compte que cette façon de procéder est la seule qui puisse englober la valeur du «blanc papier» et l'influence du réactif révélateur. Un dosage précis ne peut être obtenu que de cette manière: c'est pourquoi nous avons procédé de même pour le cuivre. Nous avons mesuré la densité optique de bandelettes vaporisées à l'acide rubéanique

de concentration 0,25 g% en fonction d'un blanc papier servant à la mise au zéro de l'appareil. Les résultats suivants sont très reproductibles.

Blanc papier en unité de densité optique	Bandelettes vaporisées mesurées en unité de densité optique		
	(1)	(2)	(3)
0,000	0,010	0,011	0,009
0,001	0,011	0,011	0,010
0,000	0,010	0,010	0,010
M/3: 0,000	*M/3: 0,010*	*M/3: 0,011*	*M/3: 0,010*

La densité optique moyenne d'une bandelette de papier filtre, vaporisée d'une manière standard par le réactif et mesurée au Beckman dans des cuvettes de 1 cm est très reproductible et vaut environ 0,010 unité. C'est ce que nous nommerons le «*blanc vaporisé standard*». On doit en tenir compte dans l'établissement de la transmission d'une tache de complexe cuivre-acide rubéanique. En possession de ces données et de celles relatives aux influences de la concentration et du volume de la prise sur les dimensions des taches chromatographiées, il est possible d'entreprendre de tracer un diagramme de référence, pour le dosage spectrophotométrique de solutions de cuivre, non chromatographié et chromatographié.

Tableau XI. Diagrammes de référence du cuivre non chromatographié et chromatographié

Spectrophotomètre Beckman — Lampe au tungstène — Phototube rouge — Cuvettes: 1 cm — Longueur d'onde: 660 mμ — Fente: 0,095 mm (Fig. 10)

Cuivre non chromatographié

Unité de densité optique corrigée p. Blanc	Ecarts à la moyenne	Unité de densité optique corrigée p. Blanc	Ecarts à la moyenne
Concentration en cuivre: 3 μg		Concentration en cuivre: 1 μg	
0,239/0,238	+ 0,0005/— 0,0005	0,091/0,090	+ 0,0006/— 0,0004
0,240/0,238	— 0,0015/— 0,0005	0,090/0,092	— 0,0004/+ 0,0016
0,237/0,239	— 0,0015/+ 0,0005	0,091/0,091	+ 0,0006/+ 0,0006
0,240/0,239	+ 0,0015/+ 0,0005	0,091/0,090	+ 0,0006/— 0,0004
0,239/0,240	+ 0,0005/+ 0,0015	0,089/0,091	— 0,0014/+ 0,0006
0,240/0,241	+ 0,0015/+ 0,0025	0,090/0,090	— 0,0004/— 0,0004
0,240/0,239	+ 0,0015/+ 0,0005	0,092/0,091	+ 0,0016/+ 0,0006
0,239/0,239	+ 0,0005/+ 0,0005	0,090/0,090	— 0,0004/— 0,0004
0,239/0,238	+ 0,0005/— 0,0005	0,089/0,090	— 0,0014/— 0,0004
M/18: 0,2385		*M/18: 0,0904*	

Continuation du tableau XI

Unité de densité optique corrigée p. Blanc	Ecarts à la moyenne	Unité de densité optique corrigée p. Blanc	Ecarts à la moyenne
Concentration en cuivre: 2 μg		Concentration en cuivre: 0,1 μg	
0,164/0,165	— 0,0009/+ 0,0001	0,025/0,024	+ 0,0007/— 0,0003
0,164/0,165	— 0,0009/+ 0,0001	0,024/0,024	— 0,0003/— 0,0003
0,166/0,165	+ 0,0011/+ 0,0001	0,025/0,025	+ 0,0007/+ 0,0007
0,165/0,164	+ 0,0001/— 0,0009	0,022/0,023	— 0,0023/— 0,0013
0,165/0,164	+ 0,0001/— 0,0009	0,023/0,026	— 0,0013/+ 0,0017
0,165/0,164	+ 0,0001/— 0,0009	0,025/0,025	+ 0,0007/+ 0,0017
0,166/0,165	+ 0,0011/+ 0,0001	0,025/0,025	+ 0,0007/+ 0,0007
0,166/0,165	+ 0,0011/+ 0,0001	0,024/0,025	— 0,0003/+ 0,0007
0,166/0,165	+ 0,0011/+ 0,0001	0,024/0,024	— 0,0003/— 0,0003
M/18: 0,1649		*M/18: 0,0243*	

Cuivre chromatographié

Unité de densité optique corrigée p. Blanc	Ecarts à la moyenne	Unité de densité optique corrigée p. Blanc	Ecarts à la moyenne
Concentration en cuivre: 3 μg		Concentration en cuivre: 1 μg	
0,245/0,246	— 0,0003/+ 0,0007	0,097/0,098	— 0,0008/+ 0,0002
0,246/0,247	+ 0,0007/+ 0,0017	0,097/0,098	— 0,0008/+ 0,0002
0,246/0,245	+ 0,0007/— 0,0003	0,097/0,098	— 0,0008/+ 0,0002
0,245/0,245	— 0,0003/— 0,0003	0,098/0,099	+ 0,0002/+ 0,0012
0,246/0,245	+ 0,0007/— 0,0003	0,098/0,099	+ 0,0002/+ 0,0012
0,244/0,245	— 0,0013/— 0,0003	0,097/0,098	— 0,0008/+ 0,0002
0,246/0,244	+ 0,0007/— 0,0013	0,098/0,097	+ 0,0002/— 0,0008
0,245/0,245	— 0,0003/— 0,0003	0,097/0,099	— 0,0008/+ 0,0012
0,245/0,246	— 0,0003/+ 0,0007	0,098/0,098	+ 0,0002/+ 0,0002
M/18: 0,2453		*M/18: 0,0978*	
Concentration en cuivre: 2 μg		Concentration en cuivre: 0,1 μg	
0,172/0,172	— 0,0004/— 0,0004	0,029/0,031	— 0,0006/+ 0,0014
0,171/0,173	— 0,0014/+ 0,0006	0,030/0,029	+ 0,0004/— 0,0006
0,172/0,173	— 0,0004/+ 0,0006	0,028/0,029	— 0,0016/— 0,0006
0,171/0,172	— 0,0014/— 0,0004	0,030/0,029	+ 0,0004/— 0,0006
0,173/0,173	+ 0,0006/+ 0,0006	0,030/0,028	+ 0,0004/— 0,0016
0,174/0,173	+ 0,0016/+ 0,0006	0,029/0,028	— 0,0006/— 0,0016
0,173/0,172	+ 0,0006/— 0,0004	0,030/0,030	+ 0,0004/+ 0,0004
0,172/0,172	— 0,0004/— 0,0004	0,031/0,031	+ 0,0014/+ 0,0014
0,172/0,173	— 0,0004/+ 0,0006	0,030/0,031	+ 0,0004/+ 0,0014
M/18: 0,1724		*M/18: 0,0296*	

Pour les éléments précédemment étudiés, nous avons toujours constaté une amélioration de la reproductibilité des résultats par chromatographie[8]. Nous voyons que le cuivre ne fait pas exception à cette règle, en examinant le Tableau XII qui nous donne les erreurs quadratiques

Tableau XII. Reproductibilité des résultats du dosage spectrophotométrique direct sur papier du cuivre non chromatographié et chromatographié

Conc. cuivre en μg	Cuivre non chromatographié		Cuivre chromatographié	
	Erreur quadratique moyenne	Erreur %	Erreur quadratique moyenne	Erreur %
3	0,0011	0,5	0,00024	0,09
2	0,0008	0,4	0,00026	0,15
1	0,0008	0,8	0,00022	0,22
0,1	0,0011	4,5	0,00032	1,08

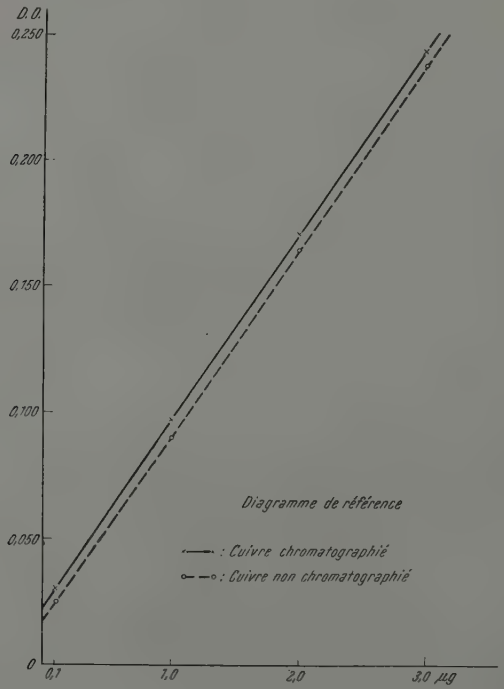

Fig. 10. Spectrophotométrie directe sur papier du complexe cuivre-acide rubéanique

moyennes et les erreurs en pourcent pour le cuivre non chromatographié et chromatographié.

Le Tableau XI nous permet encore une observation: alors que pour le dosage spectrophotométrique direct sur papier du cobalt, les droites du diagramme de référence de l'élément non chromatographié et chromatographié se différencient par un assez grand nombre d'unités de densité optique, les diagrammes de référence établis pour le cuivre dans les mêmes conditions sont *très voisins et parallèles*.

Conclusions relatives aux ultra microdosages directs du cuivre sur papier

Des trois techniques mises au point dans ce travail, il ne subsiste aucun doute que la *spectrophotométrie directe* soit la meilleure.

La *titrimétrie* et la *photométrie* sont des techniques très satisfaisantes en première approximation, car elles ne nécessitent pas d'appareillage onéreux. Leur reproductibilité dépasse celle de la colorimétrie en solution et de tout ce qui jusqu'ici était mis au point en fait de dosage direct sur papier. Les trois techniques mises au point ici se prêtent en outre à un *travail de contrôle de routine de grandes séries* relatives au *dosage de traces* d'éléments de l'ordre de 1 ou 0,1 p. p. m. chromatographié ou non. En effet, elles sont *rapides*, puisque le développement chromatographique dure en tout 45 minutes et que huit bandelettes par cuve peuvent se développer simultanément. Le dosage spectrophotométrique dure quelques secondes par tache.

La limite de sensibilité de la méthode *titrimétrique* est de l'ordre de 3 μg, tandis que les deux autres techniques permettent de descendre jusqu'à 0,1 μg.

La reproductibilité de la *photométrie directe sur papier* est de l'ordre de 0,5 à 3% pour des quantités variant de 10 à 0,1 μg, même en présence de quantités de cobalt et de zinc en solution 500 fois aussi grandes (que l'on sépare quantitativement par notre procédé chromatographique). Bien qu'il faille en principe tenir compte dans l'opacité du complexe cuivre-acide rubéanique d'une opacité se rapportant au papier vaporisé, cette correction n'a pas été apportée ici.

Pour avoir une idée exacte de cette correction, il eût été nécessaire de connaître à l'avance l'emplacement réel de la tache chromatographiée sur le papier et de déterminer pour cet endroit, l'opacité du papier vaporisé au révélateur. En négligeant de faire cette correction, l'erreur est moins grande qu'en essayant d'en appliquer une.

Cette difficulté est résolue en *spectrophotométrie directe sur papier*. La transmission de la lumière, au travers des surfaces de papier de la grandeur d'une fenêtre de cuvette de Beckman — qu'elles soient ou non vaporisées —, se mesure de manière *globale*. Les imperfections dues au papier sur cette surface donnent un effet *optique global* dont la valeur

en unité de densité optique est mesurable de façon très reproductible dans des conditions standard. Un *blanc standard spectrophotométrique* devient une réalité et de ce fait, le dosage en devient aussi rigoureux que celui pratiqué sur des solutions après élution. De même, ce dosage peut s'effectuer sans aucune restriction, ni au sujet de l'emplacement des taches à doser, ni au sujet de la nature ou de la valeur du *blanc*. La reproductibilité moyenne des *blancs* est telle qu'il suffit d'en mesurer un seul pour toute une série de dosages, ce qui constitue une énorme économie de temps. La reproductibilité des dosages spectrophotométriques oscille de 0,09 à 1,08% pour des quantités de cuivre oscillant entre 3 et 0,1 μg après chromatographié.

Nous remarquons encore que la chromatographie améliore la reproductibilité mais que son effet sur les résultats se fait sentir différemment d'un élément à un autre. Pour le cobalt le diagramme de référence du chromatographié est situé assez bien au-dessus de celui non chromatographie.

L'écart entre les unités de densité optique dans les deux diagrammes, correspondant à une même quantité d'élément, est représenté en % dans le tableau ci-contre. Tandis que pour les diagrammes correspondant au cuivre, l'ordre reste le même, mais les deux diagrammes parallèles sont très proches l'un de l'autre. Le tableau donne ces écarts en % des densités optiques.

	Cobalt	Cuivre
μg	Ecarts % entre les deux diagrammes — calculés sur la densité optique correspondant à la chromatographie	
3	22	4
2	29	7
1	44	8

Il est donc permis de dire que le comportement chromatographique de chaque individu chimique doit être étudié individuellement, surtout si l'on poursuit des recherches visant à mettre au point des techniques de chromatographie quantitative, dans des conditions standard. C'est ainsi que l'on met en lumière des facteurs d'influence, qui autrement passent inaperçus. Ici deux facteurs d'influence intéressants ont été précisés: le *volume* de la *prise* et la *concentration de la solution prélevée* permettent d'améliorer les taches du chromatogramme et de prévoir en quelque sorte leurs dimensions et leur emplacement. Pour des variations de concentration en cuivre dans les proportions de 1 à 10, les dimensions des taches peuvent varier de 20%, les plus petites taches provenant des prises les plus petites. Ce sont des données d'importance lorsqu'il s'agit de tracer un diagramme de référence destiné au dosage de solutions inconnues.

Déjà lors de la mise au point du dosage photométrique du vanadium[4] nous avions signalé que des prises différentes en volume, mais identiques

en concentration conduisent à des résultats pouvant différer entre eux de 30%. Avec ces données, nous sommes loin des techniques analytiques, où le volume de la prise et sa concentration sont les bases indiscutées sur lesquelles se calculera le résultat de l'analyse. Notons encore que les deux facteurs mentionnés ici agissent de façon tout à fait différente d'un individu à l'autre. On peut déjà s'en rendre compte en comparant à ce sujet l'étude sur le cobalt à celle sur le cuivre. On verra par la suite un comportement encore tout différent pour le zinc chromatographié sur papier. Ces remarques ne font que confirmer la complexité des phénomènes chromatographiques sur papier et la différence absolue des techniques chromatographiques quantitatives d'avec les techniques analytiques classiques. Ces facteurs confèrent aux techniques examinées ici le caractère *typiquement microchimique*.

Si la sensibilité des techniques spectrophotométriques étudiées ici est excellente, nous pouvons déjà voir qu'elle n'est pas identique dans tous les cas et qu'elle est dépendante de la façon dont le complexe et le réactif absorbent la lumière. Le nombre d'unités de densité optique sur lequel portent les mesures de taches de 1 à 0,1 μg indiquera si dans les conditions opératoires choisies la technique est extensible à des quantités plus faibles avec espoir de bonne reproductibilité. Jusqu'à 0,1 μg, la reproductibilité est bonne pour la spectrophotométrie du cuivre et du cobalt (respectivement $\pm$ 1,08% et 0,9%). Il semble qu'il y a peu d'espoir de descendre beaucoup plus bas dans l'échelle des quantités à mesurer, parce que 0,1 μg est représenté seulement par 0,0296 unité de densité optique pour le cuivre et 0,0267 pour le cobalt. La technique sera applicable à de plus faibles quantités de ces éléments si l'on dispose d'un autre réactif complexant absorbant plus fortement la lumière aux faibles concentrations ou si l'on opère dans une autre région du spectre. C'est là tout un programme de recherches, que d'examiner les courbes d'absorption de la lumière des complexes des éléments sur papier, pour amplifier les mesures spectrophotométriques aux basses concentrations, et conserver à celles-ci le même degré de reproductibilité.

Résumé

La *titrimétrie*, la *photométrie* en *lumière blanche* et la *spectrophotométrie directe sur papier* de taches de *cuivre* chromatographié ou non ont été étudiés en vue du dosage d'ultramicroquantités.

Les reproductibilités sont bonnes, mais la supériorité de la *spectrophotométrie directe sur papier* est évidente pour sa reproductibilité, sa rapidité et la possibilité de l'employer au travail de recherche aussi bien que de routine.

Zusammenfassung

Maßanalyse, Photometrie im Weißlicht und direkte Spektrophotometrie wurden vergleichsweise für die Bestimmung kleinster Mengen Kupfer in chromatographierten oder nicht chromatographierten Flecken auf Papier geprüft. Die jeweilige Reproduzierbarkeit ist gut, aber die Überlegenheit der direkten Spektrophotometrie zeigt sich an ihrer Reproduzierbarkeit, der Geschwindigkeit ihrer Durchführung und ihrer Anwendbarkeit für wissenschaftliche Untersuchungen und Routineanalysen.

Summary

Titrimetry, photometry in white light, and direct spectrophotometry on paper of copper chromatographed or not have been studied with the objective of determining ultramicro quantities.

The reproducibilities are good, but the superiority of direct spectrophotometry on paper is shown by its reproducibility, its rapidity, and the possibility of using it in research studies as well as in routine work.

Bibliographie

[1] *F. Feigl*, Chemistry of Specific, Selective and Sensitive Reactions. Amsterdam: Elsevier. 1954.

[2] *S. Sakuraba*, Japan Analyst **4**, 496 (1955).

[3] *A. Lacourt, G. Sommereyns* et *G. Wantier*, Analyst **77**, 945 (1952).

[4] *A. Lacourt, G. Sommereyns, J. Hoffmann, A. Stadler* et *G. Wantier*, C. r. acad. sci., Paris **234**, 2365 (1952); *A. Lacourt, G. Sommereyns, J. Hoffmann, S. Frank* et *G. Wantier*, Analyt. Chim. Acta **8**, 44 (1953); *A. Lacourt, G. Sommereyns, A. Stadler-Denis* et *G. Wantier*, Mikrochem. **40**, 268 (1953); *A. Lacourt* et *P. Heyndryckx*, Mikrochim. Acta [Wien] **1955**, 62.

[5] *A. Lacourt* et *P. Heyndryckx*, Mikrochim. Acta [Wien] **1955**, 62, 824.

[6] *S. Verbeustel*, Mémoire de licence en chimie; Faculté des Sciences, Université de Bruxelles, Octobre 1955.

[7] *F. H. Pollard* et *J. F. W. McOmie*, Chromatographic Methods of Inorganic Analysis. London: Butterworths Scientific Publications. 1953.

[8] *A. Lacourt* et *P. Heyndryckx*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 1211.

[9] *A. Lacourt* et *P. Heyndryckx*, Mikrochim. Acta [Wien] **1954**, 630.

[10] *A. Lacourt* et *P. Heyndryckx*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 282.

[11] *H. Flaschka*, Mikrochem. **39**, 38 (1952).

[12] *F. J. Welcher*, Organic Analytical Reagents, Tome IV. New York: 1948.

[13] *E. J. Center* et *R. M. MacIntosh*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **17**, 239 (1945).

Aus dem II. Chem. Institut der Universität Wien und dem Chemischen Laboratorium des Institutes für Gerichtliche Medizin, Wien

Spektralanalytische Untersuchungen von urzeitlichen Kupferfunden

Von

J. Derkosch, F. X. Mayer † und H. Neuninger

(Eingelangt am 8. Mai 1956)

Die Emissionsspektralanalyse hat als bedeutendes Hilfsmittel der urgeschichtlichen Forschung in den letzten Jahren allgemeine Anerkennung gefunden. Ihre Vorteile sind, neben dem für die Durchführung der Analyse erforderlichen geringen Zeitaufwand, der geringe Bedarf an Probenmaterial sowie die kleinen, noch erfaßbaren Grenzkonzentrationen (mit mittleren Spektrographen und entsprechendem Plattenmaterial etwa 0,001 bis 0,0001%). Diese Vorzüge ermöglichen es, auch wertvolle Objekte zu untersuchen, da durch die Analyse hervorgerufene Oberflächenveränderungen gering sind. Weiters gestattet eine qualitative Spektralaufnahme, bei Einhaltung bestimmter Bedingungen bereits Einstufungen der Mengenverhältnisse aus dem Vergleich der Intensitäten der Spektrallinien der verschiedenen Elemente untereinander vorzunehmen. Diese qualitativen Untersuchungen sind im allgemeinen von der Form der zu analysierenden Gegenstände unabhängig. Die Verhältnisse werden komplizierter, wenn man exakte quantitative Aussagen über die Zusammensetzung des Materials anstrebt. Man hat hier entweder die Möglichkeit, an dem Stück eine plane Fläche von etwa 10 mm Durchmesser anzuschleifen und mit einer Gegenelektrode aus Kohle oder Reinstkupfer abzufunken (Point-to-plane-Methode)[7] oder einige Milligramm des Materials in Form von Bohr- oder Feilspänen zu entnehmen, die man für die quantitative Analyse nach *J. Winkler*[15], *H. Otto* und *W. Witter*[9,10] oder *S. Junghans* und Mitarbeiter[4] zu Direktelektroden umformen kann. Man kann die Bohrspäne aber auch nach *M. van Doorselaer*[3] in Königswasser lösen, diese Lösung auf Kohleelektroden aufdampfen und nach der Methode der Lösungsspektralanalyse aufarbeiten.

Schon vor längerer Zeit wurde von *R. Pittioni*[14] angeregt, auch in Österreich spektralanalytische Untersuchungen an urzeitlichen Objekten durchzuführen. Die Arbeiten von *H. Pesta*[11–13], *M. Nießner* und *F. Morton*[8] sowie *F. X. Mayer* und *G. Machata*[6] zeigen, daß diese Anregung auf fruchtbaren Boden fiel.

Im Rahmen dieser Arbeit soll nun über die Ergebnisse einer großangelegten spektralanalytischen Reihenuntersuchung an spätsteinzeit-

lichen und frühbronzezeitlichen Objekten unter Berücksichtigung ihrer Beziehung zu den Erzlagerstätten berichtet werden. Diese Untersuchung gliederte sich in fünf Teile:

1. Untersuchung einiger Objekte auf Homogenität der Zusammensetzung;
2. Serienanalysen von mineralischem Gediegen-Kupfer;
3. Serienanalysen von spätsteinzeitlichen Objekten, die vermutlich aus mineralischem Gediegen-Kupfer erzeugt wurden;
4. Erzanalysen von Kupfererzlagerstätten, die in prähistorischer Zeit abgebaut wurden (mit Fundobjekten aus der Lagerstätte Kelchalpe bei Kitzbühel);
5. Serienanalysen von Kupferdepotfunden (Barrenringen) der frühen Bronzezeit.

Es gelangte das von *F. X. Mayer* und *G. Machata*[6] für Reihenuntersuchungen ausgearbeitete Analysenverfahren zur Anwendung: Die Objekte wurden im Wechselstromabreißbogen nach *Pfeilsticker* bei 220 V und 4 bzw. 5 A Kurzschlußstromstärke abgefunkt. Als Gegenelektrode diente ein Platinstift von 0,5 mm Durchmesser oder angespitzte spektralreine Kohle (Ruhstrat Ultrapur) im Abstand 3 mm. Der Lichtbogen wurde am Spalt des verwendeten Spektrographen (Zeiss Q 24) abgebildet, die Spaltbreite betrug 10 μ. Als Aufnahmematerial dienten Kodak Spektralplatten III-G 2. Von jedem Untersuchungsobjekt wurden zwei Aufnahmen gemacht: Die erste mit einer Belichtungszeit von 1 Minute unmittelbar nach dem Einschalten des Bogens, dann wurde die gleiche Stelle 2 Minuten ohne Belichtung abgefunkt und anschließend nochmals mit 1 Minute Belichtungszeit aufgenommen. Dadurch besteht die Möglichkeit einer Trennung der oberflächlich stets vorhandenen Fremdelemente von den eigentlichen Legierungsbestandteilen; weiters scheint sich ein bestimmter Zustand der Entladung einzustellen, der Vergleichsmöglichkeiten zwischen den einzelnen Aufnahmen erleichtert. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte visuell mit einem Spektrenprojektor unter Verwendung der Analysentafeln von *Gössler*.

1. Untersuchungen einiger Objekte auf Homogenität der Zusammensetzung

Als erstes Problem wurde das der gleichartigen Zusammensetzung eines Objektes untersucht, da die primäre Frage wohl war, ob durch die spektrographische Aufnahme einer einzigen Stelle eines Objektes bereits Aussagen über die Zusammensetzung des gesamten Stückes möglich seien. Zu diesem Zwecke wurden drei Barrenringe zerschnitten. Diese waren nach dem Stande der urgeschichtlichen Forschung verschiedenen Grundtypen zuzuordnen, gehörten also nicht zusammengehörenden Erzeugungsstätten an. Ihre Fundorte sind uns jedoch nicht bekannt gewesen. Es wurden Aufnahmen sowohl von der patinierten Objektoberfläche (Patina + metallischer Kern) als auch vom metallischen Kern (Schnittfläche) an verschiedenen Stellen gemacht. Weiters wurde eine Kreuz-

hacke, bei der auf Grund ihrer äußerlichen Beschaffenheit der Verdacht bestand, daß sie aus mehreren Stücken zusammengesetzt sei, an einigen Stellen abgefunkt.

Die Ergebnisse (s. Tabelle 1) zeigen, daß man von einer beachtenswerten Gleichmäßigkeit der Zusammensetzung über das gesamte Objekt sprechen kann. Das vereinzelte Auftreten des Elementes Vanadium in der Patina ist vermutlich eine äußerliche Verunreinigung, da es bei der Aufnahme eines Fahrspektrogrammes, das den Abbrand über einige Minuten zu verfolgen gestattet, mit der Zeit nicht mehr nachweisbar wird. Die Intensitätsschwankungen des Eisens können vernachlässigt werden, da Eisen als kennzeichnendes Element infolge seiner nahezu universellen Anwesenheit sowieso nicht in Frage kommt. Die Elemente die zur Charakterisierung einer Probe verwendet werden können, nämlich Antimon, Arsen, Blei, Nickel, Silber, Wismut und Zinn sind bei allen Aufnahmen jeweils gleichmäßig vorhanden. Die Elemente Aluminium, Calcium, Magnesium und Silicium scheiden als unspezifisch aus.

Besondere Erwähnung verdient der Barrenring Nr. 38693 des Depotfundes Sierndorf (vgl. Abschnitt 5), dessen erste Analyse eine erhebliche Mengen Blei und Zink enthaltende Bronze ergab. Da diese Analyse nicht mit den Ergebnissen an den übrigen Funden des gleichen Depots in Einklang stand, wurde eine neuerliche Aufnahme an einer anderen Stelle des Objektes gemacht, die die übliche Zusammensetzung derartiger Kupferobjekte ergab. Nach Entfernung der Patina an der Stelle der ersten Aufnahme ergab sich, daß gerade hier eine Lötung durchgeführt worden war. Beim Auftreten hoher Blei- und Zinkwerte an frühbronzezeitlichen Objekten ist also Vorsicht geboten, zumal aus der urgeschichtlichen Literatur Fälle von prähistorischen Lötungen bekannt sind (nach einer mündlichen Mitteilung von Prof. Dr. *R. Pittioni*, Wien).

Diese Ergebnisse zeigen, daß es in prähistorischer Zeit möglich war, metallurgische Objekte hoher Güte und Gleichmäßigkeit herzustellen. Die Gleichmäßigkeit der Zusammensetzung ist nur zu verstehen, wenn man annimmt, daß das Rohmaterial der untersuchten Objekte einem Schmelzprozeß unterworfen wurde und erst anschließend eine entsprechende formgebende Bearbeitung erfolgte. Die Größe der Objekte macht es unwahrscheinlich, daß diese aus natürlich vorkommendem Gediegen-Kupfer hergestellt wurden, da dieses zumindest nicht häufig in so großen Aggregaten vorkommt. Ebenso beachtlich erscheint die gleichmäßige Zusammensetzung im Hinblick darauf, daß sie Klunkerbildung und ähnliches nur geringfügig zuläßt*.

* Eine Bestätigung dieser Annahme erbrachten metallographische Untersuchungen, die am I. Physikalischen Institut der Universität Wien von Dr. *R. Müller* ausgeführt wurden und worüber dieser an anderer Stelle berichten wird.

Tabelle 1

	Ag	As	Bi	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Sb	Sn	V
Barrenring A:											
Metallkern 1	++	+	+	+++	++	Sp	—	Sp	+	Sp	—
„ 2	++	+	+	+++	++	Sp	—	Sp	+	Sp	—
Oberfläche 1	++	+	+	+++	+	Sp	—	Sp	+	Sp	—
„ 2	++	+	+	+++	+	Sp	—	Sp	+	Sp	—
Barrenring B:											
Metallkern 1	++	+	+	+++	++	—	Sp	Sp	+	Sp	—
„ 2	++	+	+	+++	++	—	Sp	Sp	+	Sp	—
Oberfläche 1	++	+	+	+++	+	—	Sp	Sp	+	Sp	—
„ 2	++	+	+	+++	+	—	Sp	Sp	+	Sp	Sp
Barrenring C:											
Metallkern 1	++	+	+	+++	++	—	Sp	Sp	+	+	—
„ 2	++	+	+	+++	+	—	Sp	Sp	+	+	—
Oberfläche 1	++	+	+	+++	+	—	Sp	Sp	+	+	Sp
„ 2	++	+	+	+++	+	—	Sp	Sp	+	+	Sp
Axt A 4795:											
Oberfläche 1	Sp	—	?	+++	Sp	—	Sp	Sp	—	—	—
„ 2	Sp	?	?	+++	Sp	—	Sp	Sp	—	Sp	—
„ 3	Sp	—	?	+++	Sp	—	Sp	Sp	—	—	—

Die als Metallkern 1 und 2, bzw. als Oberfläche 1 und 2 bezeichneten Abfunkstellen waren jeweils zwei räumlich am Untersuchungsobjekt getrennte Stellen. Für die Axt A 4795 gilt analoges wie bei den Barrenringen.

Erklärung der Zeichen:

? nicht sicher nachweisbar;

Sp Spur (2 letzte Linien schwach, aber eindeutig nachweisbar);

\+
++
+++ } bedeutet ansteigende, einwandfrei nachweisbare Mengen.

2. Serienanalysen von mineralischem Gediegen-Kupfer

Von der urgeschichtlichen Annahme ausgehend, daß die Auffindung von mineralischem, an der Erdoberfläche oder wenigstens nur einige Meter tief gelegenem Gediegen-Kupfer dem Menschen die erste Bekanntschaft mit dem Metall vermittelte, wurde versucht, Zusammenhänge zwischen den Leitelementen von Gediegen-Kupfer und Fundobjekten aus dem späten Neolithikum (jüngere Steinzeit, von zirka 2400 bis 2000 v. Chr.) aufzufinden. Da bisher nur wenige Analysen von Gediegen-Kupfer vorlagen — so von *H. Otto* und *W. Witter*[9], *M. Maczek*, *E. Preuschen* und *R. Pittioni*[5] sowie von *H. H. Coghlan*[1,2] — mußte als Grundlage eine Analysenkartei geschaffen werden, deren erste Ergebnisse hier vorliegen. Die untersuchten Proben stammen zum größten Teil aus dem siebenbürgisch-ungarisch-slowakischen Raum, der von urgeschichtlicher Seite als europäisches Ursprungsgebiet des Kupfers angesehen wird.

Tabelle 2. Analysen von mineralischem Gediegen-Kupfer

	Ag	As	Au	Bi	Cr	Cu	Mn	Pb	Sb	Sn	Te	V	Zn
Slowakei:													
Herrengrund	+					+++							
„	Sp					+++		?					
Schmöllnitz	+					+++							
„						+++							
„						+++							
„		?	?			+++							
Tischnowitz	+					+++				?			
Ungarn:													
Recsk	+					+++			?				
„						+++							
„	Sp					+++							
„	+					+++							
„ (Erlau)	Sp	?				+++		Sp					
Parad	?					+++							
Rumänien:													
Rezbanya	Sp					+++							
Moldava	Sp					+++							
„	Sp	Sp				+++			Sp				
„						+++							
„		Sp				+++							
„	Sp					+++							
Deva	Sp					+++		?					
Felsöbanya	Sp	?				+++		Sp					
Szaszka	+					+++					+		
Banat	Sp					+++							
Jugoslawien:													
Sinjakova						+++							
„						+++							
Smreka						+++	+						
Alpiner Raum:													
Simplontunnel						+++							+
Limberg/Zell a. See	Sp	Sp				+++	+	Sp					
Zell a. See (Salzburg)						+++							
Rauriser Goldberg (Salzburg)						+++							
Klücken (Salzburg)	Sp					+++		Sp					
Mühlbach (Salzburg)	Sp	Sp			+	+++		+					
Plan/St. Leonhard (Lavanttal)						+++							
„						+++							
Kallwang (Stmk.)	Sp				+	+++	Sp						
Pitten (N.-Ö.)	Sp	?				+++	+	?					
Italien:													
Imprunetta	Sp					+++							
„	Sp					+++							

(Fortsetzung der Tabelle 2)

	Ag	As	Au	Bi	Cr	Cu	Mn	Pb	Sb	Sn	Te	V	Zn
England:													
Cornwall	+					+++	?	Sp					
Deutschland:													
Zwickau	Sp	Sp		Sp		+++	Sp						
Friedrichsegen	Sp					+++							
Spanien:													
Rio Tinto						+++							
Rußland:													
Katharinenburg	+					+++							
Ural	?					– – –							
„	+	Sp				+ + +	Sp	Sp					
Nizny Tagilsk						+++							
„ „						+++							
Schweden:													
Nordschweden						+++							
Nord-Amerika:													
Oberer See	Sp					+++							
„ „	+	Sp				+++							
„ „						– – –							
Argentinien:													
Wallarow	–					– – –							
Brokenhill	–					– – –	–	–	Sp				Sp
Iran:													
Talmessi	Sp	Sp				– – –							
„	+	++			Sp	+++	Sp	?				Sp	

Weiters wurden in allen Proben die Elemente Al, Ca, Fe, Mg und Si in wechselnden Konzentrationen nachgewiesen.

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Besonders bemerkenswert ist die weitgehende Abwesenheit metallischer Verunreinigungen, wenn man von den Elementen Aluminium, Calcium, Eisen, Magnesium und Silicium absieht, die wahrscheinlich aus dem Muttergestein stammen und wegen ihrer weiten Verbreitung zur Kennzeichnung als Leitelemente ohnehin nicht in Frage kommen. Silber ist das spezifischeste Spurenelement, das in 65% der untersuchten Proben auftritt. Da das Silber in Kupfer vorwiegend nesterartig verteilt vorkommt*, ist es natürlich von der Größe der abgetunkten Stelle abhängig, ob ein solcher Einschluß bei der Analyse miterfaßt wird oder nicht. Das mag einerseits die Schwankungen bei Silber im natürlichen Vorkommen und die geringen Schwankungen – nach dem Schmelzen – im Objekt andererseits erklären. Wie

* Nach einer mündlichen Mitteilung von Dr. F. Pisani, Radcutbom.

die Tabelle zeigt, gibt es jedoch Gebiete, in denen Silber entweder nicht oder nur verschwindend selten im Kupfer vorkommt. Tellur wurde nur in einem einzigen Falle nachgewiesen, wohl bedingt durch die schwere Anregbarkeit und damit geringe Nachweisempfindlichkeit dieses Elementes, während demgegenüber bei Silber die Nachweisempfindlichkeit sehr hoch ist. Die übrigen Elemente (Antimon, Arsen, Blei, Chrom, Gold, Mangan, Vanadium, Wismut, Zinn und Zink) treten nur vereinzelt und, was vor allem betont sei, regellos auf, so daß sie besonders aus dem letztgenannten Grunde als Leitelemente ausscheiden. Die Zusammensetzung der Proben ist, wie die Analysen übersceischen Materials zeigen, weitgehend lagerstättenunabhängig. Es scheint dies in Übereinstimmung mit der allgemeinen These in der Lagerstättenkunde zu sein, daß es — zumindest bei Kupfer — keine lagerstättenspezifischen Leitelemente zu geben scheint; vereinzelte Ausnahmen mögen hier nicht in Betracht gezogen werden. In weit stärkerem Maße gilt dies noch für Erzfunde (vgl. Abschnitt 4 dieser Arbeit).

Auffällig ist das Ansteigen der Verunreinigungen bei Proben aus dem alpinen Raum, wobei hier Blei mit Arsen vergesellschaftet vorkommt und Chrom als zusätzliches Spurenelement auftritt. Allerdings kann man im alpinen Raum nicht im gleichen Sinne von Lagerstätten sprechen wie etwa in Siebenbürgen, da die Vorkommen zu gering sind, wenn es sich nicht sogar um Einzelfunde handelt, bzw. gehandelt hat. Die Annahme eines prähistorischen Abbaues dieses Kupfers scheidet aus diesem Grunde wohl aus.

Die praktisch vollständige Abwesenheit von Antimon, Wismut und Zinn gibt aber immerhin die Möglichkeit, an Fertigobjekten bei Abwesenheit dieser Elemente auf die mutmaßliche Herstellung aus Gediegen-Kupfer zu schließen.

3. Serienanalysen von spätsteinzeitlichen Objekten, die vermutlich aus mineralischem Gediegen-Kupfer erzeugt wurden

Hier wurden 35 kreuzständige Hacken untersucht, deren Fundorte eine eigenartige Parallelität zu den siebenbürgisch-ungarisch-slowakischen Kupfervorkommen zeigen.

Die Menge der Verunreinigungen ist im Vergleich zum Gediegen-Kupfer im Durchschnitt größer. So führen alle Objekte Silber, was wohl darauf zurückzuführen sein dürfte, daß beim Schmelzen des Gediegen-Kupfers — dies scheint nach den vorerwähnten Befunden so gut wie sicher zu sein — eine gleichmäßige Verteilung der Spurenelemente herbeigeführt wurde. Auffallend sind die Spuren Blei, die bei 70% der untersuchten Objekte auftreten, während sie im Gediegen-Kupfer nur in Einzelfällen aufscheinen. Die Elemente Gold, Silber und Tellur sprächen für eine Herstellung aus Gediegen-Kupfer; dagegen sind die Elemente

Antimon, Arsen, Blei und Zinn typische Kupfererzbegleiter, wie noch an Hand der Analysen in Abschnitt 4 gezeigt werden wird. Die Wahrscheinlichkeit, daß diese Objekte zur Gänze aus Kupfererz erschmolzen wurden, ist gering, da der Grad der Verunreinigung mit Fremdmetallen hierfür zu niedrig ist. Eine Möglichkeit der Deutung besteht darin, daß es sich bei dem verarbeiteten Material nicht ausschließlich um Gediegen-Kupfer gehandelt hat, sondern daß, vergesellschaftet mit diesem, eine geringe Menge Kupfererz in die Schmelze gelangte. Kupfererz ist aber reich an Spurenelementen und diese sind es wohl, die hier das Bild teilweise verschleiern.

Aber trotz dieser Erschwernisse kann wenigstens von sieben der 35 untersuchten Objekte auf Grund ihrer Zusammensetzung mit ziemlicher Sicherheit angenommen werden, daß sie ausschließlich aus Gediegen-Kupfer erschmolzen wurden; die Übereinstimmung im Reinheitsgrad ist in diesen Fällen sehr gut.

4. Erzanalysen von Lagerstätten, die in prähistorischer Zeit abgebaut wurden (mit Funden aus der Lagerstätte Kelchalpe bei Kitzbühel)

Von den in prähistorischer Zeit abgebauten Lagerstätten stand im wesentlichen nur Erzmaterial von der Kelchalpe bei Kitzbühel und vom Mitterberg bei Bischofshofen zur Verfügung. Zum größten Teil stammen diese Funde von den verschiedenen urzeitlichen Scheidehalden, geben also ein Bild jener Teufe wieder, die zu dieser Zeit abgebaut wurde. Wie ein Blick auf Tabelle 3 zeigt, sind die Proben völlig uneinheitlich. So finden sich auf der Kelchalpe Erzproben, die praktisch frei von Antimon, Arsen, Blei und Nickel sind, während *Pesta*[11] gerade die Elemente Antimon, Arsen, Blei, Nickel und Silber als typisch für diese Lagerstätte ansah. Wir bemerken also auch hier wieder die in der Lagerstättenkunde bekannte Tatsache, daß der Grad der Verunreinigungen innerhalb einer Lagerstätte bereits auf kurze Strecken stark wechseln kann. Nur ein Zufall könnte in einer Lagerstätte ein Leitelement bescheren, das für diese charakteristisch wäre. Selbst bei räumlich weit getrennten Lagerstätten besteht noch immer Übereinstimmung in den Verunreinigungen, wie die Analyse des Erzes von Bor (Jugoslawien) im Vergleich zu den Lagerstätten Kelchalpe und Mitterberg zeigt. Allerdings lag von Bor nur eine einzige Probe vor und diese kann keinesfalls als repräsentativ für die gesamte Lagerstätte angesehen werden.

Es sei ausdrücklich betont, daß sich die Verhältnisse bei Objekten, die wahrscheinlich aus Gediegen-Kupfer und solchen, die wahrscheinlich aus Erzen erstellt wurden, nach dem Gesagten grundsätzlich unterscheiden. Es kann, mit anderen Worten, bei Geräten aus Kupfer mit einiger Sicherheit auf die Herstellung aus mineralischem Gediegen-Kupfer oder Erz geschlossen werden. Eine Zuordnung der Lagerstätte des Ausgangs-

Tabelle 3. Erzanalysen

Fundort	Probe-Nr.	Ag	Al	As	Au	Bi	Ca	Co	Cu	Fe	Mg	Mn	Ni	Pb	Sb	Si	Sn	Zn
Kelchalpe, Scheidehalden	1	+	Sp	?	—	—	++	—	+++	+++	++	+	?	Sp	—	++	Sp	—
	2	+	?	?	—	—	++	?	+++	+++	++	+	?	Sp	—	++	Sp	—
	3	+	+	Sp	—		+	Sp	+++	+++	+	+	?	Sp	—	++	Sp	Sp
	4	+	Sp	Sp	—	—	++	Sp	+++	+++	++	+	?	—	—	++	Sp	Sp
	5	+	Sp	?	?	—	++	—	+++	+++	++	+	—	—	?	+	?	—
	6	+	+	Sp	—	—	+	?	+++	+++	+	+	Sp	?	—	++	Sp	Sp
	7	+	+	Sp	—	—	+	Sp	+++	+++	+	—	—	Sp	?	++	+	—
	8	Sp	Sp	Sp	—	—	+	—	+++	+++	Sp	—	—	?	—	+	?	—
Mitterberg, Scheidehalden	1	Sp	Sp	?	—	—	++	—	+++	+++	++	+	—	—	—	++	Sp	—
	2	Sp	Sp	Sp	—	—	++	—	+++	+++	++	++	—	—	—	++	Sp	—
	3	Sp	+	Sp	—	—	++	—	+++	+++	++	++	Sp	Sp	—	+	Sp	—
	4	Sp	Sp	Sp	—	—	++	—	+++	+++	++	++	?	?	?	+	Sp	—
	5	—	—	Sp	—	—	+	—	+++	+++	+	+	?	—	—	+	Sp	—
	6	Sp	+	?	—	?	++	—	+++	+++	++	++	—	—	—	+	?	—
	7	Sp	+	?	—	?	++	—	+++	+++	++	+	—	—	—	+	?	—
Mitterberg, rezent (Josefi-Oberbau-Stollen)	1	Sp	Sp	+	—	—	++	—	+++	+++	+	+	+	Sp	?	+	Sp	—
	2	Sp	Sp	Sp	—	—	++	—	+++	+++	++	+	Sp	—	—	+	Sp	Sp
Viehhofen, Scheidehalden	1	Sp	Sp	Sp	—	—	Sp	+	+++	+++	+	+	+	?	—	+	Sp	Sp
	2	+	Sp	Sp	—		+	Sp	+++	+++	+	+	Sp	Sp	—	+	Sp	?
	3	+	—	+	—	—	Sp	Sp	+++	+++	+	+	?	+	—	+	Sp	Sp
Unter-Sulzbach, rezent	1	+	Sp	—	—	—	Sp	—	+++	+++	+	+	—	Sp	—	+	Sp	+
Bor, rezent	1	Sp	Sp	+	—	—	+	—	+++	+++	—	—	—	Sp	—	++	Sp	+

materials zu dem Fundobjekt erscheint aber in beiden Fällen zumindest sehr problematisch. Einen Ausnahmefall bildet dabei nur das Element Tellur, das für die siebenbürgischen Lagerstätten als charakteristisch angesehen wird.

Als Beispiel für die auftretenden Schwierigkeiten möge die Tabelle 4 dienen, die Analysen von Funden aus dem Gebiet der Kelchalpe zeigt. Diese Objekte wurden mit größter Wahrscheinlichkeit aus dem an Ort und Stelle gewonnenen Kupfererz erschmolzen, sollten also in ihren Verunreinigungen ein getreues Bild der Lagerstätte wiederspiegeln. Selbst wenn man nun die Bronzeobjekte ausschließt — unter der Annahme, daß das zugesetzte Zinn mit seinen unspezifischen Verunreinigungen die Verhältnisse verschiebt —, so wird das Bild nicht übersichtlicher. Hinzu kommt noch die primitive Technik, mit der das Metall erschmolzen wurde, die sicher nicht unter optimalen Bedingungen ablief und nicht reproduzierbar war, so daß, wie die Analyse der Schlacke Nr. 1588 zeigt, ein Teil der Spurenelemente — wahrscheinlich einmal mehr, einmal weniger — in die Schlacke ging. Bemerkenswert ist das Auftreten des Elementes Wismut in einem Teil der Fundobjekte, während es in keiner Erzprobe nachgewiesen werden konnte. Die Herkunft dieses Elementes ist vorläufig noch ungeklärt.

Tabelle 4. Funde aus der Lagerstätte Kelchalpe

	Ag	As	Bi	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Sb	Sn	Zn
Inv.-Nr. 1433 Sichel	Sp	Sp	—	Sp	—	+++	+	—	+	Sp	—	+	—
Inv.-Nr. 1435 Nadel	++	+	+	Sp	—	+++	+	+	+	+	+	++	Sp
Inv.-Nr. 1436 Nadel	++	Sp	+	Sp	—	+++	+	—	Sp	+	Sp	++	Sp
Inv.-Nr. 1437 Nadel	+	?	?	—	—	+++	Sp	—	Sp	Sp	—	++	—
Inv.-Nr. 1477 Ring	++	+	+	+	—	+++	+	?	+	+	+	++	Sp
Inv.-Nr. 1586 Nadel	+	Sp	—	Sp	—	+++	+	+	Sp	Sp	?	+	?
Inv.-Nr. 1587 Stift	+	+	Sp	+	—	+++	+	?	+	+	+	+	—
Inv.-Nr. 1588 Schlacke ..	Sp	Sp	—	Sp	Sp	++	+++	+	?	Sp	—	Sp	Sp

Allerdings ist trotz dieser außerordentlich schwierigen Auswertbarkeit für die urgeschichtliche Forschung die Möglichkeit nicht von der Hand

zu weisen, daß einmal beim Vorliegen einer entsprechend großen Anzahl von Analysen wenigstens eine großräumige Zuordnung auf statistischer Basis getroffen werden kann.

In diesem Lichte kann man auch die Sicherheit, mit der *H. Otto* und *W. Witter*[9] ihre Theorie verfechten, daß das arsenhaltige Kupfer den mitteldeutschen Lagerstätten entstamme, wegen der zu geringen Anzahl von Analysen nicht gutheißen.

5. Serienanalysen von Kupferdepotfunden der frühen Bronzezeit

Um einen Überblick über die großräumige Gleich- oder Ungleichartigkeit von Kupferobjekten zu erhalten — der Nachweis der Gleichartigkeit spräche für intensive Handelstätigkeit —, wurden drei vollständige Depotfunde gleicher urgeschichtlicher Datierung mit insgesamt 161 Barrenringen aus dem niederösterreichischen Raum untersucht.

Es handelte sich dabei um folgende Funde:

Senning bei Stockerau	26	Barrenringe
Sierndorf bei Stockerau....	78	„
Kilb bei Melk	57	„

Wie gezeigt werden konnte, sind nahezu alle Objekte vom gleichen Grundtypus:

Ag	As	Bi	Cu	Fe	Sb
++	+	+	+++	Sp	+

Dazu treten noch vereinzelt Spuren von Blei, Chrom, Mangan, Nickel und Zinn auf.

Es zeigen sich damit allerdings wesentliche Unterschiede gegenüber den von *F. X. Mayer* und *G. Machata*[6] untersuchten Objekten von Wildendürnbach (Ob. Weinviertel), die von Seite der Urgeschichte mit den Funden von Senning, Sierndorf und Kilb zeitlich gleich datiert werden. Die Wildendürnbacher Objekte gehören folgendem Grundtypus an:

Ag	As	Bi	Cr	Cu	Fe	Ni	Pb	Sb	Sn	Zn
+++	++	Sp	Sp	+++	+	++	+	Sp	++	+

Während es sich also bei diesen um Kupfer mit einem hohen Silbergehalt und geringeren Mengen Arsen, Nickel und Zinn handelt, ist der Silbergehalt bei den von uns untersuchten Kupferobjekten erheblich geringer, Nickel und Zinn ist — mit wenigen Ausnahmen — nicht, Arsen in geringerer Menge, Antimon in größerer Menge als im Wildendürnbacher Fund vorhanden.

Auffällig ist weiters das starke Auftreten von Wismut. Die hier beobachtete Vergesellschaftung der Elemente Antimon und Arsen mit Wismut läßt — mit den in Abschnitt 4 erwähnten Einschränkungen — den Schluß auf eine außeralpine Herkunft der verwendeten Kupfererze zu, da Wismut in den von uns untersuchten alpinen Kupfererzen fehlt.

Im Sierndorfer Fund treten bemerkenswerterweise fünf Barrenringe von folgendem Grundtypus auf:

Ag	As	Bi	Cu	Fe	Pb	Sb	Sn
+	Sp	Sp	+++	Sp	Sp	Sp	Sp

Möglicherweise handelt es sich dabei um umgearbeitete Objekte aus dem späten Neolithikum, da diese Zusammensetzung zumindest auf die starke Mitverwendung von Gediegen-Kupfer schließen läßt.

Bei Blei, Chrom, Mangan, Nickel und Zinn mag es sich vielleicht um eingeschleppte Verunreinigungen handeln. Hier muß aber auch die Möglichkeit eines Umschmelzens zerbrochener oder unbrauchbar gewordener Objekte in prähistorischer Zeit in Betracht gezogen werden. Weiters ist in Erwägung zu ziehen, daß Erze verschiedener Herkunft zusammen verschmolzen wurden, was verständlicherweise das Mengenverhältnis der verunreinigenden Elemente verändert hat. Diese unkontrollierbaren Prozesse machen es zusammen mit den erwähnten Schwierigkeiten bei der Lagerstättenzuordnung praktisch unmöglich, ein Herkunftsgebiet anzugeben. Die Aussage aber, daß die Objekte aus Kupfererz erschmolzen wurden, kann mit großer Sicherheit gemacht werden.

Die Verfasser danken der Österreichischen Akademie der Wissenschaften sowie Herrn Univ.-Prof. Dr. *R. Pittioni* für die großzügige Unterstützung, die die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte.

Zusammenfassung

Es wird über die Ergebnisse spektralanalytischer Untersuchungen an Kupferfunden der späten Steinzeit und der frühen Bronzezeit berichtet. Nach der Prüfung einiger Objekte auf Homogenität der Zusammensetzung wurden Analysen von mineralischem Gediegen-Kupfer und Objekten, die vermutlich aus diesem hergestellt wurden, durchgeführt. Weiters wurden Kupfererze aus in prähistorischer Zeit abgebauten Lagerstätten sowie aus diesen erschmolzene Objekte untersucht. Es zeigt sich dabei, daß die Schwierigkeiten, die einer Zuordnung dieser Objekte zu bestimmten Lagerstätten im Wege stehen, sehr groß sind.

Summary

A report is given regarding the results of spectral analytical studies of copper finds of the late stone age and the early bronze age. After testing several objects regarding homogeneity of composition, analyses were made of native copper and objects, which presumably were made from the former. Furthermore, copper ores from sites that were worked out in prehistoric times were studied and also objects cast from such ores. It was found that the difficulties of ascribing these objects to particular ore sites are very great.

Résumé

Comptes rendus de résultats des recherches par analyse spectrale effectuées sur des objets de cuivre appartenant à la fin de l'âge de pierre ou au début de l'âge de bronze. On a contrôle l'homogénéité de la composition de quelques uns d'entre eux et effectué l'analyse de cuivre natif, ainsi que celle d'objets que selon toutes vraisemblances il avait servi à fabriquer. Des minerais de cuivre provenant de campements des temps préhistoriques, et des objets obtenus par fusion de ces minérais ont été également soumis aux investigations des auteurs. La démonstration de l'appartenance de ces objets à des campements déterminés présente des difficultés considérables.

Literatur

[1] *H. H. Coghlan*, MAN 1951, S. 90.

[2] *H. H. Coghlan*, Antiquaries J. **22**, 22 (1942).

[3] *M. van Doorselaer*, Mikrochem. **36/37**, 513 (1951).

[4] *S. Junghans, E. Klein* und *E. Scheufele*, 34. Bericht d. röm.-german. Kommission 1951—1953, S. 77.

[5] *M. Maczek, E. Preuschen* und *R. Pittioni*, Archäologia Austriaca, H. 10, 61 (1952) und H. 12, 67 (1953).

[6] *F. X. Mayer* und *G. Machata*, Österr. Chem.-Ztg. **54**, 178 (1953).

[7] *N. H. Nachtrieb*, Principles and Practice of Spectrochemical Analysis. New York: McGraw-Hill. 1950.

[8] *M. Nießner* und *F. Morton*, Mitt. a. d. Museum i. Hallstatt, A. Vorgeschichtl. Reihe, Nr. 1 (1947); Nr. 2 (1948).

[9] *H. Otto* und *W. Witter*, Handbuch der ältesten vorgeschichtlichen Metallurgie in Mitteleuropa. Leipzig: Barth. 1952.

[10] *H. Otto*, Spectrochim. Acta **1**, 381 (1939).

[11] *H. Pesta*, Mitt. d. prähist. Komm. d. österr. Akad. d. Wiss. **3**, 146 (1937).

[12] *H. Pesta*, Blätter f. Heimatkunde **15**, 66 (1937).

[13] *H. Pesta*, Wiener Prähist. Z. **24**, 80 (1937).

[14] *R. Pittioni*, Mitt. d. prähist. Komm. d. österr. Akad. d. Wiss. **5**, 103 (1944—51).

[15] *J. E. R. Winkler*, Veröff. d. Landesanstalt f. Volkheitskunde Halle, H. 7 (1935).

Aus dem Institut für organische Chemie der Universität Ljubljana, Jugoslawien

Eine Methode zur quantitativen Bestimmung der wasserunlöslichen Mutterkornalkaloide auf papierchromatographischem Wege

Von

J. Kolšek

(Eingelangt am 9. Mai 1956)

In einer der vorhergehenden Arbeiten[1] wurde die Notwendigkeit einer analytischen Methode zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Mutterkornalkaloide in einem Gemisch sämtlicher Vertreter dieser Stoffklasse dargelegt. Wir waren bestrebt, an Hand der Erfahrungen anderer Autoren ein geeignetes papierchromatographisches Trennungsverfahren zu finden, das nicht nur eine qualitative, sondern auch eine quantitative Bestimmung der einzelnen Mutterkornalkaloide ermöglichen würde. In der Literatur ist bis zum heutigen Tag eine größere Anzahl Arbeitsverfahren erwähnt, nach denen eine Abtrennung bestimmter Mutterkornalkaloide aus einem Gemisch herbeigeführt werden kann. Allgemein kann aber immer noch behauptet werden, daß keine dieser Methoden eine vollkommene Auftrennung aller Komponenten des Gemisches in einem einzigen Chromatogramm herbeizuführen vermag. Bei hohem Trenneffekt liegen bei einer großen Zahl der Komponenten die Flecke nahe beisammen, so daß schon der qualitative Nachweis erschwert wird. Um so schwieriger wird natürlich in solchem Fall die quantitative Bestimmung der einzelnen Alkaloide, besonders dann, wenn ihr Mengenverhältnis sehr ungleich ist. Von den im Schrifttum angeführten Methoden für papierchromatographische Trennung der Mutterkornalkaloide haben besonders die beiden von *K. Macek* und Mitarbeitern empfohlenen Verfahren, die im System Benzol/Formamid bzw. Benzol-Benzin-Gemisch/Formamid arbeiten, unser Interesse erweckt. Die beiden Methoden wurden eingehender studiert und auch die R_f-Werte für die rechtsdrehenden Alkaloide der Ergotoxingruppe bestimmt, die in den Arbeiten dieser Autoren nicht zu finden waren. Auf Papierstreifen von 1 cm Breite, die mit einer Zunge versehen waren, konnte der Trenneffekt merklich

gesteigert werden. Die Arbeitsweise mit schmalen Papierchromatogrammen bringt außerdem noch den Vorteil, daß die Alkaloide nach erfolgter Auftrennung auf einer kleinen Fläche begrenzt bleiben, was besonders für die quantitative Arbeit von großem Nutzen ist.

Die Versuche zur quantitativen Bestimmung der Alkaloide auf Papierchromatogrammen an Hand der Farbreaktion mit dem *Van Urk*schen Reagens haben gezeigt, daß der Nachweis der Alkaloide auf dem Papier mit unfiltrietem UV-Licht eine teilweise Zersetzung der Substanz mit sich bringt, weshalb eine Bestimmung der absoluten Menge des Alkaloids in einem Fleck nicht möglich ist. Mit voller Sicherheit läßt sich bei diesem Nachweisverfahren nur das Verhältnis der Farbintensität einzelner Flecke bestimmen, für eine absolute Auswertung ist noch eine kolorimetrische Bestimmung der nichtchromatographierten Lösung erforderlich[2].

An Hand dieser Erfahrungen wurde eine Methode zur quantitativen Auswertung eines Gemisches sämtlicher Mutterkornalkaloide ausgearbeitet, die eine Bestimmung der einzelnen Alkaloide des Gemisches mit einer Genauigkeit von durchschnittlich 1 bis 2% ermöglicht. Die Auftrennung der einzelnen Alkaloide wird nicht in einem einzigen Chromatogramm herbeigeführt, sondern durch Kombination beider von *Macek* und Mitarbeitern empfohlenen Arbeitsverfahren, teils nach der aufsteigenden, teils nach der absteigenden Methode erreicht. Auf kurzen Papierchromatogrammen wird zuerst das Verhältnis der „Blauwerte" für einzelne Alkaloidgruppen bestimmt, auf Chromatogrammen normaler Länge werden diese Gruppen dann weiter zerlegt. Bei dieser Arbeitsweise, die zwar mehr Zeit in Anspruch nimmt, wird die Genauigkeit der Bestimmung merklich erhöht. Wird der Prozentanteil der einzelnen Alkaloide aus einem einzigen Chromatogramm ermittelt, so kommt der Fehler einer einzelnen Bestimmung auch bei allen anderen Komponenten zum Ausdruck.

Wie schon oben erwähnt, wurden alle chromatographischen Trennungen im System Benzol/Formamid bzw. Benzol-Petroläther/Formamid durchgeführt. Wird Formamid als immobile Phase und Benzol als bewegliche Phase verwendet, so wird ein Gemisch der Mutterkornalkaloide entsprechend den ansteigenden R_f-Werten in folgende Fraktionen aufgetrennt: 1. Lyserg- und iso-Lysergsäure; 2. Lumiergotamin; 3. Ergotamin; 4. Ergosin; 5. Ergotaminin + Ergosinin; 6. Ergocristin + Ergocornin; 7. Ergokryptin; 8. Ergocristinin + Ergocorninin + Ergokryptinin.

Auf Papierchromatogrammen von 1 cm Breite und 20 cm Länge wird in dem gleichen System mit der aufsteigenden Methode die Trennung in vier Fraktionen erreicht: 1. Lyserg- und iso-Lysergsäure + Lumiergotamin; 2. Ergotamin + Ergosin; 3. Ergotaminin, Ergosinin + linksdrehende Alkaloide der Ergotoxingruppe; 4. Ergocristinin, Ergocorninin und Ergokryptinin. Das Entwickeln solcher Chromatogramme nimmt nur ungefähr 1 Stunde in Anspruch und gestattet eine Beurteilung

der Qualität eines Rohgemisches der Mutterkornalkaloide, da man auf diese Weise die Menge bis zur Lysergsäure zersetzter Alkaloide, die Menge der physiologisch aktiven linksdrehenden Alkaloide der Ergotamingruppe und die Menge der rechtsdrehenden Alkaloide der Ergotoxingruppe quantitativ ermitteln kann. Die chromatographische Trennung läßt sich in 100-ml-Meßzylindern (Höhe 25 cm, Durchmesser 3 cm) bequem durchführen. Diese Auftrennung wird schon auf einem Chromatogramm von etwa 12 bis 15 cm Länge herbeigeführt. Solche Chromatogramme sind geeignet, wenn die Bestimmung der Menge eines rechtsdrehenden Alkaloids neben seiner linksdrehenden Form erfolgen soll (z. B. Ergotaminin neben Ergotamin). Für ein Gemisch sämtlicher Mutterkornalkaloide reicht diese Länge zu einer vollkommenen Trennung nicht aus und es werden für die Ergotamin und Ergosin enthaltende Fraktion zu hohe Werte erhalten. Chromatogramme dieser Länge sind für Bestimmungen der Lyserg- und iso-Lysergsäure, die meist in sehr kleinen Mengen vorliegen, gut geeignet. Um eine gute Trennung zu erreichen, entwickelt man nach der aufsteigenden Methode, nimmt das Chromatogramm aus der Kammer, läßt das Lösungsmittel verdunsten und entwickelt nochmals in derselben Weise. Man erreicht dadurch eine gute Abtrennung der übrigen Komponenten von der Lysergsäure, die auf dem Startpunkt bleibt, und bestimmt dann das Verhältnis des Lysergsäureanteiles gegenüber der Summe aller übrigen Komponenten des Gemisches.

In demselben System wird nach der absteigenden Methode eine Auftrennung von Ergotamin und Ergosin herbeigeführt. Obwohl sich diese beiden Alkaloide auf langen Chromatogrammen gut voneinander trennen, ist es ratsam, diese Trennung auf Chromatogrammen von etwa 30 cm Länge vorzunehmen. Man entwickelt bis zum Überfließen, wobei die Alkaloide der Ergotoxingruppe teilweise über den unteren Rand des Papierstreifens geschwemmt werden, hierbei aber eine scharfe Trennung der linksdrehenden Alkaloide der Ergotamingruppe erreicht wird. Hierbei wird auch Lumiergotamin von der Lysergsäure abgetrennt und kann quantitativ erfaßt werden. Um den Trenneffekt noch weiter zu steigern, werden die Papierstreifen mit einer Zunge versehen[1].

Die Auftrennung der linksdrehenden Alkaloide der Ergotoxingruppe muß auf Chromatogrammen von etwa 50 cm Länge vorgenommen werden. Im System Benzol/Formamid wandern Ergocristin und Ergocornin gemeinsam und werden als Summe bestimmt, Ergokryptin läßt sich dagegen abgesondert erfassen. Die Differenz der Wanderungsgeschwindigkeiten für Ergotaminin + Ergosinin einerseits und Ergocristin-Ergocornin anderseits ist im System Benzol/Formamid sehr klein und es wird nicht immer eine genügend scharfe Trennung beider Gruppen erreicht. Um eine bessere Trennung herbeizuführen, muß ein anderes Lösungsmittelsystem angewandt werden.

Schon *Macek* und Mitarbeiter[3,4] konnten mit Formamid als immobiler Phase und Benzol-Benzin-Gemisch (6 : 4) als mobiler Phase eine Auftrennung des Ergotoxinkomplexes erreichen. In diesem System werden auch die Wanderungsgeschwindigkeiten der Alkaloide der Ergotamingruppe merklich herabgesetzt. *Macek* und Mitarbeiter benutzten dieses System zur semiquantitativen Bewertung der Alkaloide in Einzelsklerotien. Da die genannten Autoren keine R_f-Werte für die rechtsdrehenden Alkaloide der Ergotoxingruppe angegeben haben, versuchten wir, diese zu bestimmen. Gleichzeitig wurden auch die R_f-Werte anderer Reinalkaloide ermittelt und mit denjenigen verglichen, die aus der Abbildung eines Chromatogrammes der genannten Autoren[3] entnommen wurden. Die Bestimmung der R_f-Werte wurde ähnlich wie in einer vorhergehenden Arbeit[1] auf Papierchromatogrammen von 1 cm Breite mit einem Gemisch von 6 Vol.-Teilen Benzol und 4 Vol.-Teilen Petroläther (Siedeintervall 40 bis 75°) als mobiler Phase durchgeführt. Die erhaltenen R_f-Werte sind in der Tabelle 1 zusammengestellt:

Tabelle 1

	Chromatogramme mit 1 cm Breite	R_f-Werte nach *Macek* und Mitarbeitern
Ergotamin	0,003	0,002
Ergosin	0,006	0,004
Ergotaminin / Ergosinin	0,22	0,17
Ergocristin	0,33	0,31
Ergocornin	0,40	0,38
Ergokryptin	0,49	0,52
Ergocristinin	0,63	—
Ergocorninin	0,67	—
Ergokryptinin	0,74	—
d-Lysergsäure / iso-Lysergsäure	0,00	0,00

Auch hier kann eine gute Übereinstimmung der R_f-Werte mit den von *Macek* und Mitarbeitern gefundenen festgestellt werden. Ähnlich wie im System Benzol/Formamid macht sich auch hier gegenseitige Beeinflussung der Wanderungsgeschwindigkeiten einzelner Komponenten in einem Gemisch bemerkbar. Trotz der Differenz der R_f-Werte der einzelnen rechtsdrehenden Alkaloide der Ergotoxingruppe wird ein Gemisch dieser Stoffe nicht scharf getrennt. Meist wandern Ergocristinin und Ergocorninin gemeinsam und es wird nur eine teilweise Abtrennung von Ergokryptin herbeigeführt.

Wie aus der Tabelle 1 hervorgeht, ist in diesem System die Differenz der R_f-Werte von Ergotaminin und Ergosinin einerseits und Ergocristin

anderseits genügend groß, um eine scharfe Trennung dieser Komponenten zu erzielen. Dies kann gut auf Chromatogrammen von etwa 22 cm Länge in 100-ml-Meßzylindern (Höhe 25 cm, Durchmesser 3 cm) nach der aufsteigenden Methode durchgeführt und dann das Verhältnis der „Blauwerte" der gesamten Ergotamingruppe gegenüber der Ergotoxingruppe ermittelt werden.

Nach der absteigenden Methode kann weiter auf Papierstreifen von 50 cm Länge, die mit einer Zunge versehen sind, eine Trennung von Ergocristin und Ergocornin erreicht werden, wodurch auch diese beiden Alkaloide quantitativ erfaßt werden. Selbstverständlich kann auch auf demselben Chromatogramm die quantitative Bestimmung von Ergokryptin erfolgen.

Durch eine Kombination der aufsteigenden und absteigenden Arbeitstechnik und beider Lösungsmittelsysteme ist es uns gelungen, ein Verfahren zu finden, das auch eine Auftrennung und quantitative Bestimmung der rechtsdrehenden Alkaloide der Ergotoxingruppe gestattet. Im System Benzol/Formamid wurde auf Chromatogrammen von 50 cm Länge nach der aufsteigenden Methode ein Gemisch der Mutterkornalkaloide wie oben beschrieben in vier Fraktionen aufgetrennt. Um eine scharfe Trennung zu erreichen, läßt man das Lösungsmittel etwa 20 cm emporsteigen. Das Chromatogramm wird nun aus der Kammer herausgenommen und im UV-Licht die Lage der vierten Fraktion, die die rechtsdrehenden Alkaloide der Ergotoxingruppe enthält, markiert. Der erste Teil des Papierstreifens, auf dem sich die ersten drei Fraktionen befinden, wird abgeschnitten und kann zu deren quantitativer Auswertung dienen. Das Chromatogramm mit den rechtsdrehenden Alkaloiden der Ergotoxingruppe wird nun nach dem absteigenden Arbeitsverfahren mit dem Gemisch Benzol-Petroläther (6 : 4) weiter entwickelt, wodurch eine vollkommen scharfe Auftrennung aller drei Komponenten des Gemisches erreicht wird. In der Reihenfolge der ansteigenden R_f-Werte finden sich Ergocristinin, Ergocorninin und Ergokryptinin vor und können in derselben Weise quantitativ kolorimetrisch bestimmt werden.

Nach der oben beschriebenen Methode wurde die quantitative Bewertung eines Gemisches der Mutterkornalkaloide durchgeführt. Nach erfolgter chromatographischer Auftrennung wurden die im UV-Licht markierten Zonen ausgeschnitten und nach der Methode von *Pöhm* und *Fuchs*[5] mit einem Gemisch von Weinsäure- und p-Dimethylaminobenzaldehyd-Lösung bis zur Papierzerfaserung geschüttelt und nach einigem Stehenlassen und darauffolgender Filtration zur Messung gebracht. In einigen Fällen, wenn die Begrenzung der Zonen im UV-Licht nicht deutlich genug war, wurde das Zerschneiden der Zonen nach dem Anfärben mit dem *Van Urk*schen Reagens vorgenommen[2]. Die Messungen

wurden in 1-cm-Küvetten mit dem lichtelektrischen Kolorimeter nach B. Lange durchgeführt, wobei folgende Extinktionswerte verzeichnet wurden:

Tabelle 2

Zusammensetzung der Fraktion	Extinktion		Prozentanteile der „Blauwerte"		Mittelwert %
Lysergsäure, Ergotamin und Ergosin	0,018	0,050	18,7	19,1	18,9
Ergotaminin, Ergosinin und Ergotoxingruppe	0,078	0,212	81,3	80,9	81,1
Lysergsäure	0,003	0,006	6,6	8,8	7,7
Ergotamin und Ergosin	0,043	0,062	93,4	91,2	92,3
Ergotamin	0,010	0,013	58,8	59,1	59,0
Ergosin	0,007	0,009	41,2	40,9	41,0
Lysergsäure und Ergotamingruppe	0,021	0,017	33,9	34,7	34,3
Ergotoxingruppe	0,041	0,032	66,1	65,3	65,7
Ergotamin und Ergosin	0,017	0,010	45,9	43,5	44,7
Ergotaminin und Ergosinin	0,020	0,013	54,1	56,5	55,3
Ergocristin, Ergocornin und Ergokryptin ..	0,022	0,051	47,8	47,2	47,5
Ergocristinin, Ergocorninin und Ergokryptinin	0,024	0,057	52,2	52,2	52,5
Ergocristin	0,017	0,019	28,8	31,1	29,9
Ergocornin	0,021	0,020	35,6	32,8	34,2
Ergokryptin	0,021	0,022	35,6	36,1	35,9
Ergocristinin	0,013	0,020	23,6	22,7	23,2
Ergocorninin	0,014	0,022	25,5	25,0	25,2
Ergokryptinin	0,028	0,046	50,9	52,3	51,6

Aus den erhaltenen Resultaten ist die Berechnung der Prozentanteile der einzelnen Komponenten dieses Gemisches möglich. Diese Rechnung ergibt folgende Werte:

Lysergsäure + Ergotamingruppe 34,3%
- Lysergsäure + Ergotamin + Ergosin 18,9%
  - Lysergsäure 1,5%
  - Ergotamin 10,3%
  - Ergosin 7,1%
- Ergotaminin + Ergosinin 15,4%

Ergotoxingruppe 65,7%
- Linksdrehende Alkaloide 31,2%
  - Ergocristin 9,3%
  - Ergocornin 10,7%
  - Ergokryptin 11,2%
- Rechtsdrehende Alkaloide 34,5%
  - Ergocristinin 8,0%
  - Ergocorninin 8,7%
  - Ergokryptinin 17,8%

Selbstverständlich bedarf es für eine quantitative Analyse eines Alkaloidgemisches bei weitem nicht aller oben angeführten Einzelbestimmungen. Dies wurde hier gemacht, um zu kontrollieren, ob die gleichen Resultate auch dann erhalten werden, wenn das gegenseitige Verhältnis der „Blauwerte" anderer Fraktionen ermittelt wird. So wurde z. B. die Menge der Ergotaminin und Ergosinin enthaltenden Fraktion einmal indirekt als Differenz der „Blauwerte" für Ergotamingruppe und Ergotamin + Ergosin ermittelt, das andere Mal dagegen das Verhältnis beider Fraktionen (Ergotamin + Ergosin : Ergotaminin + Ergosinin) direkt gemessen. In gleicher Weise wurde eine direkte Bestimmung der Lysergsäure und die Bestimmung der Ergotoxingruppe im System Benzol/Formamid in einem einzigen Chromatogramm durchgeführt. Ein Vergleich der erhaltenen Resultate ist an Hand der Tabelle 3 möglich.

Tabelle 3

	Gemessen %	Berechnet %	Differenz %
Ergotamin + Ergosin	14,7	17,4	2,7
Ergotaminin + Ergosinin	18,1	15,4	2,7
Ergocristin + Ergocornin	17,1	20,0	2,9
Ergokryptin	11,4	11,2	0,2
Ergocristinin + Ergocorninin + Ergokryptinin	37,0	34,5	2,8
Lysergsäure	2,0	1,5	0,5

Aus der Tabelle geht hervor, daß die Resultate unabhängig davon, welcher Reihenfolge nach das Verhältnis der „Blauwerte" der einzelnen Fraktionen zueinander ermittelt wurde, stets gut übereinstimmen. Wenn auch verschiedene Lösungsmittelsysteme zur Anwendung gelangten, liegt der durchschnittliche Fehler bei etwa 1,9%, was für Bestimmungen dieser Art vollkommen zufriedenstellend ist. Durch Anwendung eines empfindlicheren Photometers (Beckman, Unicam) ließe sich die Fehlergrenze wahrscheinlich noch etwas herabsetzen.

Gegenüber einer Bestimmung der Zusammensetzung eines Gemisches sämtlicher Mutterkornalkaloide, die mehr Zeit in Anspruch nimmt, kann eine Bestimmung des durch Isomerisation physiologisch unwirksam gewordenen Anteiles eines einzigen Reinalkaloids recht schnell durchgeführt werden. Mit Hilfe der aufsteigenden „Test-Tube"-Chromatographie führten wir eine Kontrolle etwa 2 Jahre alter Gynergen-Injektionslösungen (Ergotamin-tartrat der Firma Sandoz-Basel), die bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert wurden, durch. Neben Spuren von

Lysergsäure und Lumiergotamin wurden für den Gehalt an Ergotamin bzw. Ergotaminin folgende Werte erhalten:

	Einzelbestimmungen %			Mittelwert %
Ergotamin	74,3	73,8	71,0	73,1
Ergotaminin	25,7	26,2	29,0	26,9

Bei allen oben angeführten Beispielen sind die Resultate der Messungen als Prozentanteile der erhaltenen „Blauwerte" ausgedrückt. Da die Farbintensität bei den einzelnen Reinalkaloiden bekanntlich vom Lysergsäureanteil im Molekül abhängig ist, müssen bei der Berechnung der Gewichtsverhältnisse einzelner Alkaloide eines Gemisches die Molekulargewichte in Betracht gezogen werden. Handelt es sich um eine Bestimmung eines einzigen Reinalkaloids (z. B. Ergotamin-Ergotaminin), so sind in diesem Fall die erhaltenen Prozentanteile der „Blauwerte" mit den Gewichtsanteilen zahlenmäßig identisch.

Die Brauchbarkeit der ausgearbeiteten Methode zur quantitativen Bestimmung einzelner Mutterkornalkaloide in einem Gemisch wurde an einem Beispiel gezeigt. Durch eine Kombination der Lösungsmittelsysteme und der Arbeitsmethodik gelang auch eine Abtrennung und quantitative Bestimmung der rechtsdrehenden Alkaloide der Ergotoxingruppe. Mit diesen Lösungsmitteln konnte dagegen eine deutliche Abtrennung von Ergotaminin und Ergosinin nicht erreicht werden. Obwohl diese Arbeitsweise mehr Zeit in Anspruch nimmt, liegen die Vorteile dieser Methode klar auf der Hand. Da bei sämtlichen Bestimmungen nur das Verhältnis der einzelnen Fraktionen untereinander ermittelt wird, verlangt diese Arbeitsweise kein Abwägen der Substanz oder Abmessen der Menge der Alkaloidlösung, die auf den Startpunkt aufgebracht wird. Es erübrigt sich das strenge Einhalten der Zeit, die nach Reagenszusatz zur völligen Farbentwicklung nötig ist, wenn nur die beiden Vergleichslösungen gleichzeitig zur Messung gebracht werden. Ebenso spielt bei dieser Arbeitsweise das Alter des *Van Urk*schen Reagens keine entscheidende Rolle. Das Arbeiten auf kurzen Chromatogrammen ermöglicht nach dem Zerschneiden der Zonen das Eluieren in Eprouvetten, wobei die gesamte Länge des Papierstreifens zur Elution gelangt. Auf langen Chromatogrammen können Verluste eintreten, da zwischen den einzelnen Flecken haftende minimale Substanzmengen nicht erfaßt werden. Soll eine einwandfreie chromatographische Trennung eines Substanzgemisches herbeigeführt werden, so darf eine bestimmte obere Konzentrationsgrenze der auf den Startpunkt aufzubringenden Lösung nicht überschritten werden, da sonst ein „Zusammenfließen" zweier nahe beisammenliegender

Flecke auftritt. Wird eine kleine Substanzmenge in einem einzigen Chromatogramm in mehrere Einzelkomponenten aufgetrennt, so fällt in einem Fleck eine äußerst geringe Substanzmenge an, wodurch die quantitative Bestimmung sehr erschwert wird und die Genauigkeit der Messung leidet. Auf kurzen Chromatogrammen werden mehrere Einzelkomponenten in einer Fraktion gemeinsam erfaßt, so daß die Lösung nach der Elution eine genügende Farbintensität aufweist, die bequem und genau kolorimetriert werden kann. Bei der späteren Bestimmung der Einzelkomponenten dieser Fraktion können zwar geringe Schwankungen der Resultate auftreten, diese bleiben jedoch nur innerhalb der betreffenden Fraktion begrenzt.

Es ist unsere Absicht, nach der beschriebenen Methode einige einheimische Drogen aus der Umgebung von Zagreb zu analysieren, worüber an anderer Stelle berichtet werden soll.

Dem Vorstand des Institutes, Frau Prof. Dr. Ing. *M. Perpar*, bin ich für die kritische Überprüfung der zur Veröffentlichung gelangenden Darstellung zu herzlichstem Dank verpflichtet.

Zusammenfassung

Es wird eine Methode zur papierchromatographischen Trennung und quantitativen Bestimmung der einzelnen wasserunlöslichen Mutterkornalkaloide in einem Gemisch beschrieben. Die Fehlergrenze dieser Methode beträgt durchschnittlich 1 bis 2%. Die Methode ist für die Bestimmung der Einzelalkaloide in Drogen, Drogenextrakten und in Gemischen isolierter Mutterkornalkaloide, wie auch zur schnellen Ermittlung des physiologisch aktiven Anteiles der einzelnen Reinalkaloide in verschiedenen Mutterkornpräparaten geeignet. Durch Kombination des auf- und absteigenden Arbeitsverfahrens und verschiedener Lösungsmittelsysteme konnte nach der Methode von *Macek* und Mitarbeitern auch die Auftrennung der rechtsdrehenden Alkaloide der Ergotoxingruppe erreicht werden.

Summary

A method is described for the paper chromatographic separation and quantitative determination of the individual water-insoluble ergot alkaloids in a mixture. The limits of error of this method average 1 to 2%. The method is suitable for the determination of the individual alkaloids in drugs, drug extracts, and in mixtures of isolated ergot alkaloids, and likewise for the rapid determination of the physiologically active portion of the individual pure alkaloids in various ergot preparations. By combination of the ascending and descending procedure and various solvent systems, the method of *Macek* and collaborators was successfully applied also for the separation of the dextro-rotating alkaloids of the ergotoxin group.

Résumé

Description d'une méthode de séparation de leurs mélanges et de détermination quantitative par chromatographie sur papier des alcaloïdes individuels de l'ergot de seigle insolubles dans l'eau. La limite d'erreur correspondante atteint en moyenne 1 à 2%. La méthode convient aux dosages des alcaloïdes individuels dans les drogues, les extraits de drogues et les mélanges d'alcaloïdes isolés de l'ergot de seigle ainsi qu'à la détermination rapide de la fraction physiologiquement active des alcaloïdes purs individuels dans différentes préparations à base d'ergot de seigle. La combinaison des techniques chromatographiques par voie ascendante et descendante jointe à l'emploi de différents solvants a permis de réaliser également la séparation des alcaloïdes dextrogyres du groupe de l'ergotoxine d'après la méthode de *Macek* et de ses collaborateurs.

Literatur

[1] *J. Kolšek*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 1377.
[2] *J. Kolšek*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 1500.
[3] *K. Macek* und *S. Vaněček*, Pharmazie **10**, 422 (1955).
[4] *K. Macek*, *M. Semonský*, *S. Vaněček* und *A. Černý*, Naturwiss. **42**, 647 (1955).
[5] *M. Pöhm* und *L. Fuchs*, Naturwiss. **40**, 244 (1953).

Aus dem Institut für anorganische und analytische Chemie der Universität Graz

Nitratbestimmung mit Phenarsazinsäure

Von

R. Pietsch

Mit 1 Abbildung

(Eingelangt am 11. Mai 1956)

Die in einer früheren Arbeit[1] mitgeteilte Farbreaktion von Nitrat mit Phenarsazinsäure, die darauf beruht, daß Nitrat bzw. freie Salpetersäure außerordentlich leicht die Phenarsazinsäure nitriert und das Reaktionsprodukt in alkalischer Lösung ein stark gefärbtes chinoides Natriumsalz bildet, wurde auf ihre Brauchbarkeit zur kolorimetrischen Bestimmung von Nitrat untersucht. Wie infolge der Farbtiefe und der sich daraus ergebenden großen Empfindlichkeit zu erwarten war, ist die Methode besonders zur Bestimmung kleiner Nitratmengen geeignet. Wenn sich auch größere Mengen selbstverständlich gut und leicht nachweisen lassen, so bedingt doch die Intensität der Farbe, daß die Meßgenauigkeit absinkt. Für Mengen zwischen 10 und 150 μg Nitrat ist diese Methode jedoch sehr gut und mit der bei kolorimetrischen Arbeiten üblichen Genauigkeit durchführbar.

Die Arbeitsvorschrift, die im nachstehenden mitgeteilt werden soll, lehnt sich im wesentlichen an die schon zum qualitativen Nitratnachweis verwendete an. Da die auftretende rote Farbe dem *Beer*schen Gesetz nur in einem kleinen Bereich von etwa 10 bis 70 μg Nitrat gehorcht, die auftretenden Färbungen und die Empfindlichkeit jedoch noch eine Bestimmung größerer Mengen ermöglichen, ist es vorteilhaft, eine Eichkurve aufzustellen und die Bestimmungen danach durchzuführen. Die Eichkurve wird in üblicher Weise unter Verwendung gestellter Nitratlösungen hergestellt. Man verarbeitet entsprechende Nitratmengen nach der weiter unten angegebenen Arbeitsvorschrift, wobei es zweckmäßig ist, jeden einzelnen Wert mehrmals zu bestimmen und dann erst den Mittelwert aus diesen Einzelmessungen in die Eichkurve aufzunehmen.

Mittels der auf diese Weise erhaltenen Eichkurve können nun Nitratgehalte unbekannter Lösungen nach der gleichen Vorschrift auch in größeren Konzentrationsbereichen bestimmt werden.

Reagenzien:

a) Eine 0,3%ige alkalische Lösung von Phenarsazinsäure stellt man durch Auflösen von 300 mg aus verd. Essigsäure umkristallisierter lufttrockener Phenarsazinsäure[2] (besser Phenarsazinsäureacetat) in 100 ml Wasser her, dem man 0,2 ml 30%iger Natronlauge zugesetzt hat. Eine größere Menge Alkali, die eventuell zum Lösen unreiner Phenarsazinsäure nötig wäre, stört dadurch, daß bei längerem Stehen in der Kälte das Natriumsalz der Phenarsazinsäure aus der stark alkalischen Lösung ausfällt und die Lösung erst nach Erwärmen wieder gebrauchsfähig wird. Die Lösung soll vollkommen farblos sein[3]. Sie wird in einer braunen Flasche aufbewahrt und hält sich im Dunkeln sehr lange.

b) Konz. Schwefelsäure.

c) 30%ige wäßrige Natronlauge.

Apparat:

Zur Messung der Lichtabsorption bzw. der Extinktion der entstandenen Färbungen diente ein Universalkolorimeter nach *Dr. B. Lange* unter Verwendung eines hellgrünen Filters und 100-ml-Küvetten. Die Messungen wurden nach der Ausschlagsmethode vorgenommen, wobei als Vergleichslösung ein nach derselben Methode hergestellter Blindwert diente. Diese Vorsichtsmaßnahme ist jedoch nur dann notwendig, wenn die Phenarsazinsäurelösung infolge mangelnder Reinheit des Präparates oder nicht genügend sorgfältiger Aufbewahrung eine rötliche Eigenfarbe angenommen hat, die durch Lichteinwirkung[3] entsteht und der Intensität des Lichtes proportional ist. Tritt diese Eigenfarbe nicht auf, so kann ohne großen Fehler auch reines Wasser als Vergleichslösung verwendet werden.

Arbeitsvorschrift:

Die zu analysierenden Lösungen bzw. bei Aufstellung der Eichkurve die entsprechenden Mengen der in ihrer Konzentration bekannten Nitratlösungen werden in 50-ml-Bechergläsern im Trockenschrank eingedampft. Sind die Lösungen sauer, so setzt man vorher noch etwas Natriumhydrogencarbonat p. A. Merck zu. Hierauf nimmt man mit 1 ml 0,3%iger Phenarsazinsäurelösung auf, setzt vorsichtig 1 ml konz. Schwefelsäure zu und schüttelt um. Hierauf werden die Probenbechergläser für 10 Minuten in ein siedendes Wasserbad eingestellt. Inzwischen beschickt man 100-ml-Meßkolben mit je 20 ml 30%iger Natronlauge. Nach Ablauf von 10 Minuten werden die nunmehr gelb gefärbten Lösungen in den Bechergläsern

mit Wasser verdünnt und quantitativ in die vorbereiteten Maßkolben übergeführt. Man füllt zur Marke auf und schüttelt gründlich durch. Hierauf wird die rote Färbung gegen eine in gleicher Weise behandelte Blindprobe gemessen. Aus der an der Galvanometerskala abgelesenen Absorption bzw. Extinktion wird nun nach Mittelung mehrerer Ergebnisse die Eichkurve gezeichnet bzw. mit deren Hilfe der Nitratgehalt der unbekannten Lösung ermittelt.

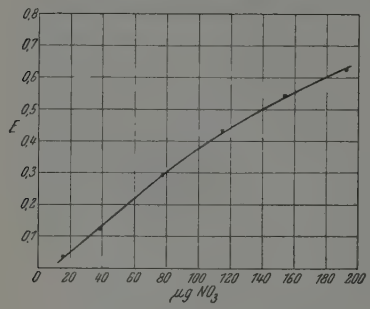

Abb. 1. Eichkurve der Nitratbestimmung

Tabelle 1

NO_3^- in µg	Gemessene Extinktion
15,4	0,039
38,5	0,128
77,0	0,292
115,5	0,432
154,0	0,540
192,0	0,627

In der angegebenen Weise wurden die in der Tabelle 1 angegebenen Werte erhalten, die graphisch aufgetragen die Eichkurve der Abb. 1 ergeben.

Bezüglich der Ergebnisse ist zu sagen, daß sie durch geringe Abweichungen von der Arbeitsvorschrift nicht stark beeinflußt werden. Die angewendete Menge von 1 ml 0,3%iger Phenarsazinsäurelösung ist sehr reichlich bemessen, wenn man Nitratmengen im angegebenen Konzentrationsbereich zu bestimmen hat. Falls nötig, kann die Konzentration der verwendeten Phenarsazinsäure bis auf etwa 0,1% erniedrigt werden, ohne daß bei Mengen bis zu 150 µg Nitrat Störungen eintreten. Es soll auch betont werden, daß die Farbtiefe ausschließlich von der Nitratmenge abhängt und durch die Menge des verwendeten Überschusses an Phenarsazinsäure nicht beeinflußt wird.

Die Beständigkeit der Farbe ist sehr gut. Wenn man auch schon sofort nach Alkalisieren der Nitrierungslösung kolorimetrieren kann, so hält sich die Farbe, wenn die Maßkolben unter Lichtabschluß aufbewahrt werden, doch einige Tage.

Die Schwefelsäure wird in konz. Form angewendet, da sich gezeigt hat, daß die Acidität des Nitrierungsgemisches auf die geringste noch bestimmbare Menge Nitrat einen maßgeblichen Einfluß ausübt. Anderseits ist eine große Säurekonzentration bei der Bestimmung größerer Nitratmengen ohne Einfluß, wobei auf die Tatsache hingewiesen werden soll, daß man sogar konz. Schwefelsäure als Lösungsmittel für Phenarsazinsäure verwenden kann.

Die Menge von 20 ml 30%iger wäßriger Natronlauge ist so bemessen, daß sie die verwendete Säure neutralisiert und darüber hinaus noch eine genügende Alkalität ergibt, um die Bildung der chinoiden Form des Natriumsalzes des Nitrierungsproduktes zu ermöglichen. Eine Verringerung der Menge ist wenig ratsam, da sie die Farbstärke verringert, was auf Kosten der Empfindlichkeit geht. Die in der Arbeitsvorschrift angegebene Menge ist willkürlich angenommen und kann ohne Bedenken vergrößert werden, nur muß sie bei Aufstellung der Eichkurve und der nachfolgenden Bestimmung gleich groß gehalten werden. Eine geringe Änderung der Natronlaugenmenge innerhalb einiger Milliliter, entsprechend auch eine geringe Variation der Schwefelsäuremenge, ist auf die Ergebnisse praktisch ohne Einfluß, wie auch auf die Abkühlung der Maßkolben zur Beseitigung der auftretenden Neutralisationswärme meist verzichtet werden kann. Man sieht daher, daß die Methode ohne besonders genaue Einhaltung der vorgeschriebenen Mengen verwendet werden kann, was besonders für die Ausführung von Routineanalysen wichtig erscheint.

Einflüsse begleitender Ionen auf die Nitratbestimmung

Ein vom qualitativen Verhalten abweichendes Bild ergeben die Halogene. Beim qualitativen Nachweis störten anwesende Halogene fast gar nicht, wenn man von einem geringen Nachlassen der Farbstärke absieht. Dies mag einerseits dadurch bedingt sein, daß beim qualitativen Nachweis größere Mengen (etwa 3 mg Nitrat) als bei der quantitativen Bestimmung verwendet wurden, anderseits dadurch, daß eine Verminderung der Farbtiefe qualitativ keine große Rolle spielt, während sie beim quantitativen Arbeiten natürlich untragbar ist.

Wie sich gezeigt hat, bewirkt die Anwesenheit von Halogenen bei der quantitativen Bestimmung von gewissen Verhältnissen an starke Störungen. Diese sind dadurch gegeben, daß andere Farbtöne auftreten, aber auch dadurch, daß allem Anschein nach die Halogenwasserstoffsäuren in freier Form — besonders Brom- und Jodwasserstoffsäure — eine Umsetzung der Phenarsazinsäure bewirken.

Bei den Grenzverhältnissen von Nitrat und Halogen, bei denen noch eine einwandfreie Bestimmung möglich ist, spielt die Menge des bei der Bestimmung vorliegenden Nitrates eine große Rolle. Auch kommt hierbei ein Unterschied im Verhalten von Salzsäure einerseits und Brom- und Jodwasserstoffsäure anderseits zum Ausdruck (s. Tabelle).

NO_3^- in g	Begleition	Maximal mögliches Gewichtsverhältnis NO_3^- : Halogen
38	Cl^-	1 : 4
154		1 : 4
38	Br^-	1 : 2
154		1 : 0,3
38	J^-	1 : 1
154		1 : 0,1

Während bei Anwesenheit von Chloridion das maximal mögliche Verhältnis gleichbleibt, nimmt es bei Bromid- und Jodidion mit steigenden Nitratmengen ab.

Da jedoch im Vergleich dazu im qualitativen Versuch sogar die Schwefelsäure im Nitriergemisch durch Salzsäure ersetzt werden kann und sich obiger Unterschied im Verhalten von Chlorid gegenüber den Halogenen Brom und Jod zeigt, wurde auch untersucht, ob sich nicht auch bei der quantitativen Bestimmung die Schwefelsäure durch Salzsäure ersetzen ließe. Dies ist auch ohne weiteres möglich, nur treten gewisse Schwierigkeiten auf, die durch die Natur der Säure bedingt sind und nicht einer störenden Wirkung des Chloridions angelastet werden können. So ist das Arbeiten in offenen Bechergläsern im siedenden Wasserbad nicht möglich, da die geringe vorhandene Menge an Säure dabei leicht verdampft. Ferner zeigt sich ein großer Einfluß der im Nitriergemisch vorliegenden Säurekonzentration. Werden diese beiden Punkte jedoch, etwa durch Verwendung geschlossener Gefäße bei der Nitrierung und peinliche Einhaltung gleicher Säurekonzentration, beachtet, so läßt sich die Nitratbestimmung auch mit Salzsäure an Stelle von Schwefelsäure ausführen.

Bemerkt werden soll noch, daß ein Ersatz der Schwefelsäure durch Brom- oder Jodwasserstoffsäure nicht möglich ist.

Sind nun in einer Lösung mehr Halogenionen vorhanden als eine unmittelbare Bestimmung in ihrer Gegenwart erlauben und soll die Bestimmung nach der angegebenen Vorschrift erfolgen, so können sie leicht durch Silber ausgefällt werden. Man verwendet dazu eine gesättigte wäßrige Lösung von reinem Silbersulfat. Nach Zusatz einer entsprechenden Menge wird erwärmt und nach Abkühlen entweder sofort filtriert oder der Überschuß von Silber auch noch durch Zusatz von Natriumhydrogencarbonat ausgefällt. Im ersteren Falle muß dies getrennt nachgeholt werden oder man kann das Silber durch einen Ionenaustauscher entfernen, wie später angeführt wird. Auf diese Weise gelang es leicht, Nitratbestimmungen nach vorheriger Abtrennung der mehr als hundertfachen Menge der Halogene Chlor, Brom und Jod durchzuführen.

Der Einfluß anderer gleichzeitig vorhandener Anionen verhält sich so, wie es nach den qualitativen Versuchen zu erwarten war. Die Ionen SO_4^{2-}, CO_3^{2-}, PO_4^{3-}, CH_3COO^-, BO_2^-, $C_2O_4^{2-}$, $C_4H_4O_6^{2-}$, WO_4^{2-}, MoO_4^{2-}, AsO_4^{3-}, AsO_3^{3-}, SiO_3^{2-} stören durchwegs in mehr als 2000facher Menge noch nicht. In einzelnen Fällen können Ionen sogar in mehr als 6000facher Menge anwesend sein, ohne die Bestimmung irgendwie zu beeinflussen.

Für einige andere Anionen, die die Bestimmung mehr oder weniger beeinflussen, gibt die Tabelle 2 die maximal möglichen Gewichtsverhältnisse an.

Das Nitrition liefert unter gleichen Arbeitsbedingungen eine ganz analoge Färbung, jedoch mit wesentlich geringerer Empfindlichkeit. Da die Färbung nicht zu unterscheiden ist, läßt sich auch kein Gewichtsverhältnis angeben, bis zu dem die Anwesenheit von Nitrit nicht stört. Es dürfen vielmehr bei einer Bestimmung nicht mehr als etwa 40 μg Nitrition anwesend sein. Die dieser Menge entsprechende Färbung ist geringer als die Schwankungen der Einzelwerte von Nitratbestimmungen um den jeweiligen Mittelwert.

Tabelle 2

Begleition	Maximalverhältnis
F^-	1 : 1500
SO_3^{2-}	1 : 500
VO_4^{3-}	1 : 5
ClO_3^-	1 : 2
BrO_3^-	1 : 8
JO_3^-	1 : 5

Der Einfluß gleichzeitig anwesender Metallionen hängt davon ab, ob sie gefärbt sind oder nicht, bzw. ob sie in alkalischer Lösung als Hydroxyde ausfallen oder, wie etwa Aluminium, gelöst bleiben. Dies ist außer bei Aluminium noch bei Blei und Zink und auch bei Magnesium der Fall; die Anwesenheit dieser Metalle stört die Nitratbestimmung nicht. Andere Metalle, wie Nickel, Cadmium, Calcium, Eisen, Kupfer, Kobalt und Mangan, stören entweder durch ihre Eigenfarbe in alkalischer Lösung (Kupfer) oder durch die Trübung infolge der ausfallenden Hydroxyde. Bei den Erdalkalien entsteht eine Trübung durch Carbonatfällung, da die angewendete Natronlauge nur selten genügend carbonatfrei ist. Wenn sich auch durch Komplexon manche Störungen, wie die eben erwähnte Carbonatfällung bei den Erdalkalien, beseitigen lassen ohne nennenswerte Abweichungen von den theoretisch zu erwartenden Färbungen befürchten zu müssen, so ist es doch besser, die störenden Metalle vor der Nitratbestimmung zu entfernen. Dies kann entweder durch Fällung der Metalle als Carbonate erfolgen oder durch Anwendung eines Ionenaustauschers. Besonders nach dem Eintragverfahren hat sich diese als sehr günstig und leicht durchführbar erwiesen. Versuche, die mit dem Austauscher Lewatit S 100 der Farbwerke Bayer durchgeführt wurden, haben sehr gute Ergebnisse gezeigt, die auch keine größeren Schwankungen als bei Einzelbestimmungen der betreffenden Nitratmengen ergaben. Der Austauscher wurde in der neutralen, mit Kalium beladenen Form angewendet, etwa 5 Minuten einwirken gelassen, hierauf abfiltriert und mit etwas Wasser ausgewaschen. Nachdem aus Sicherheitsgründen dem nur mehr Kalium enthaltenden Filtrat noch etwas reinstes Hydrogencarbonat zugefügt wurde, konnte die Bestimmung nach der normalen Vorschrift durchgeführt werden. Eine Abgabe oder ein Zurückhalten von Nitrationen durch den genannten Austauscher konnte nicht beobachtet werden.

Zusammenfassung

Eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung von Nitrat bzw. Salpetersäure im Mikromaßstab wird angegeben. Die Bestimmung kann unmittelbar neben zahlreichen Kationen und Anionen ausgeführt werden. Andere Ionen, die die Bestimmung beeinflussen, lassen sich leicht abtrennen. Die Methode dürfte sich besonders zur Nitratbestimmung in Wasser sowie zur Bestimmung von Nitratverunreinigungen in Chemikalien eignen.

Summary

A colorimetric method for the determination of nitrate or nitric acid is given. The determination can be conducted directly in the presence of numerous cations and anions. Other ions, which affect the determination, can be easily removed. The method may be suitable particularly for the determination of nitrate in water and also for the determination of nitrate contamination in chemicals.

Résumé

Description d'une méthode colorimétrique pour le dosage de nitrates ou d'acide nitrique à l'échelle microanalytique. Ce dosage peut être directement effectué en présence de nombreux cations et anions. Certains ions qui perturbent la détermination sont susceptibles d'être facilement éliminés. La méthode est particulièrement appropriée au dosage des nitrates dans l'eau ou sous forme d'impuretés dans les produits chimiques.

Literatur

[1] *R. Pietsch*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 1490.
[2] *H. Wieland* und *W. Rheinheimer*, Ann. **423**, 1 (1921).
[3] *C. P. A. Kappelmeier*, Rec. trav. chim. Pays-Bas **49**, 84 (1930).

Aus dem Institut für organische Chemie der Universität Ljubljana, Jugoslawien

Quantitative Bestimmung einzelner wasserunlöslicher Alkaloide in Mutterkorn jugoslawischer Herkunft

Von

J. Kolšek

(Eingelangt am 16. Mai 1956)

Die übliche kolorimetrische Bestimmungsmethode, nach der eine Bewertung des Mutterkorns erfolgt, gestattet neben der Ermittlung des Gesamtalkaloidgehaltes einer Droge nur noch die getrennte Bestimmung der Menge der wasserlöslichen und wasserunlöslichen Alkaloide. Die Gruppe wasserlöslicher Alkaloide enthält ausschließlich Ergometrin (neben Ergometrinin); deswegen wird der Alkaloidgehalt dieser Gruppe auf Ergometrin umgerechnet. Anders liegen die Verhältnisse bei der Gruppe wasserunlöslicher Mutterkornalkaloide. Diese Gruppe enthält fünf Alkaloide (Ergotamin, Ergosin, Ergocristin, Ergocornin und Ergokryptin), so daß also einschließlich ihrer isomeren Umlagerungsformen zehn Komponenten vorliegen. Wiewohl die Farbintensität, die eine jeweils gleiche Menge eines dieser fünf Alkaloide mit dem *Van Urk*schen Reagens liefert, verschieden ist, ist es üblich, den Gehalt dieser Alkaloidgruppe auf Ergotamin oder Ergotoxin umzurechnen, da man nach der kolorimetrischen Bestimmungsmethode keinen Einblick in die relative Zusammensetzung dieser Gruppe gewinnt. Man muß sich aber von vornherein im klaren sein, daß die Wiedergabe der Resultate auf diese Weise zu einem Mißverständnis führen könnte, wenn z. B. der Alkaloidgehalt einer reinen Ergotoxindroge, die praktisch kein Ergotamin enthält, zahlenmäßig auf Ergotamin umgerechnet wird. Dient eine Droge als Rohstoff für die Isolierung der Alkaloide, die dann zur Herstellung verschiedener therapeutischer Präparate weiterverarbeitet werden, ist eine eingehende Analyse der Zusammensetzung der Gruppe wasserunlöslicher Alkaloide unumgänglich. Hier genügt es nicht, den Gehalt einzelner Komponenten dieser Gruppe zu bestimmen, sondern auch die Menge

der stereoisomeren Umlagerungsformen der einzelnen Vertreter muß quantitativ ermittelt werden, da bekanntlich nur die in optisch linksdrehender Form vorliegenden Alkaloide pharmakologisch aktiv sind.

Die einzige bis heute bekannte analytische Methode, die eine zufriedenstellende Lösung der Probleme in dieser Hinsicht zu bringen vermag, ist die Chromatographie. An Hand des eingehenden Studiums der bisher gemachten Fortschritte auf diesem Gebiet und durch eigene Weiterentwicklung wurde eine papierchromatographische Methode ausgearbeitet, die eine quantitative Bestimmung der einzelnen wasserunlöslichen Mutterkornalkaloide gestattet. Nach dieser Methode führten wir bisher Analysen der Gemische isolierter Mutterkornalkaloide und Bestimmungen der physiologisch aktiven Form der Einzelalkaloide in Mutterkornpräparaten durch[1]. Es soll an dieser Stelle einerseits die Anwendbarkeit dieser Methode zur Analyse der Droge, anderseits aber die Zusammensetzung der Gruppe wasserunlöslicher Alkaloide in einigen Drogen einheimischer Herkunft, die nach dieser Methode analysiert wurden, gezeigt werden.

Es wurden fünf Muster jugoslawischen Mutterkorns aus der Umgebung von Zagreb einer Analyse unterworfen. Die Drogen wurden im Sommer 1955 geerntet und wurden uns im Januar 1956 zur Verfügung gestellt. Die Extraktion der Alkaloide mit Äther wurde nach der vorhergehenden Entfettung der Droge mit Petroläther in Soxhletapparaten durchgeführt. Die Bestimmung der Gesamtalkaloide wurde auf kolorimetrischem Wege mit p-Dimethylaminobenzaldehyd durchgeführt und die Resultate in üblicher Weise auf Ergotamin umgerechnet. Auf papierchromatographischem Wege wurde die Zusammensetzung der Gruppe wasserunlöslicher Alkaloide quantitativ ermittelt. Da die Farbintensität, die eine jeweils gleiche Menge eines Alkaloids mit dem *Van Urk*schen Reagens liefert, von dem Lysergsäureanteil im Molekül abhängig ist, müssen zur Ermittlung der Gewichtsprozentanteile die Molekulargewichte in Betracht gezogen werden. Die auf diese Weise erhaltenen Resultate der Analyse sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Alle Werte sind in Prozenten angegeben. In der ersten Spalte ist die auf Ergotamin-Base berechnete Menge der Gesamtalkaloide wiedergegeben. In der zweiten Spalte ist der Prozentanteil der Gesamtalkaloide zu finden, der die Summe der Einzelalkaloide darstellt. Diese Werte sind durchwegs etwas niedriger als jene, die durch Umrechnung auf Ergotamin erhalten werden, da das Molekulargewicht von Ergotamin etwas über dem Mittelwert der Molekulargewichte wasserunlöslicher Mutterkornalkaloide liegt und außerdem hier die Menge wasserlöslicher Alkaloide nicht einbezogen ist.

Tabelle 1

Bezeichnung der Droge	Gesamtalkaloide ber. auf Ergotamin	Summe der Einzelalkaloide	Lysergsäure	Ergotamin	Ergosin	Ergotaminin + Ergosinin	Ergocristin + Ergocornin	Ergokryptin	Ergocristinin Ergocorninin Ergokryptinin	Weitere Einzelbestimmungen
Nr. 1	0,190	0,180	0,0085	0,0156	0,0104	0,0358	0,0406	0,0166	0,0529	Ergocristinin 0,0100 Ergocorninin 0,0098 Ergokryptinin 0,0331
Nr. 2	0,278	0,258	0,0017	0,0785	0,0361	0,0375	0,0814	0,0215	0,0011	
Nr. 3	0,270	0,251	0,0088	0,0254	0,0143	0,0526	0,0399	0,0206	0,0892	Ergocristinin + Ergocorninin 0,0583 Ergokryptinin 0,0309
Nr. 4	0,175	0,165	0,0092	0,0556	0,0077	0,0662	0,0052	0,0054	0,0160	
Nr. 5	0,302	0,295	0,0026	0,1331	0,0144	0,0485	0,0644	0,096	0,0257	Ergocristin 0,0557 Ergocornin 0,0087

Um eine schnelle Übersicht über die Mengenverhältnisse der einzelnen Alkaloidgruppen in den analysierten Drogen zu gewinnen, wurden auch diese Prozentanteile berechnet. Sie sind aus Tabelle 2 ersichtlich.

Tabelle 2

Bezeichnung der Droge	Lysergsäure	Ergotamingruppe			Ergotoxingruppe		
		Ergotamingruppe	Linksdrehende Alkal.	Rechtsdrehende Alkal.	Ergotoxingruppe	Linksdrehende Alkal.	Rechtsdrehende Alkal.
Nr. 1	9,7	34,3	14,4	19,9	56,0	26,7	29,3
Nr. 2	1,3	59,0	44,4	14,6	39,7	35,4	4,3
Nr. 3	7,1	36,9	15,8	21,1	56,0	20,4	35,6
Nr. 4	5,6	78,3	38,3	40,0	16,1	6,4	9,7
Nr. 5	1,9	65,4	48,9	16,5	32,7	25,3	7,4

Sämtliche Werte geben die Prozentanteile in bezug auf die Menge der Gesamtalkaloide an.

An Hand der vorliegenden Resultate soll an dieser Stelle gezeigt werden, daß nur die chromatographische Analyse eine sichere Bewertung der Droge ermöglicht. Die kolorimetrische Bestimmung ergibt zwar die Gesamtmenge der Alkaloide, besagt aber weiter nichts über die Zusammensetzung des Alkaloidgemisches der Droge. Für die industrielle Auswertung der Droge, besonders noch wenn es sich um die Herstellung physiologisch und therapeutisch sehr wirksamer Präparate auf Ergotaminbasis handelt, liegt die Notwendigkeit einer chromatographischen Bestimmung noch besonders deutlich auf der Hand. Nach den Resultaten der kolorimetrischen Bestimmung der Gesamtalkaloide käme von den oben angeführten Mutterkornmustern Droge Nr. 5 an erste Stelle und Droge Nr. 4 als alkaloidärmste an letzte Stelle. Nach der papierchromatographischen Analyse könnte dagegen Droge Nr. 4 als mehr oder weniger ausgesprochene Ergotamindroge bezeichnet werden, die für industrielle Zwecke zweifellos den Vorrang verdient. Obwohl die Drogen Nr. 2 und 3 einander hinsichtlich des Gesamtalkaloidgehaltes ziemlich gleichstehen, konnten auch hier deutliche Unterschiede im Ergotamingehalt festgestellt werden. In bezug auf den Prozentanteil der Ergotamin- und Ergotoxingruppe sind die Drogen Nr. 1 und 3 fast vollkommen identisch, obwohl sie im Gesamtgehalt der Alkaloide voneinander sehr abweichen. Diese beiden Drogen könnte man als Mutterkorn der ausgesprochenen Gemischgruppe bezeichnen, bei denen ein hoher Ergokryptingehalt (27,6% bzw. 19,1%) auffällt. Der Ergosingehalt ist bei den meisten Drogen relativ niedrig (3,6 bis 5,8%); die Droge Nr. 2, die einen Ergosingehalt von 13,0% aufweist, weicht davon ab.

Wie schon oben erwähnt, wurde die Extraktion der Alkaloide mit Äther in Soxhletapparaten vorgenommen. Gegen die warme Extraktion wurde schon an mehreren Stellen Einspruch erhoben, denn es soll bei einer größeren Extraktionsdauer ein Teil der Alkaloide zu Lysergsäure zersetzt werden. Da in unseren Drogen trotz 8stündiger Extraktionsdauer auch sehr niedere Werte für den Lysergsäuregehalt ermittelt wurden (1,3% bzw. 1,9%), dürfte diese Annahme nicht als allgemein gültig angesehen werden. Es ist weiter bemerkenswert, daß bei den Drogen mit hohem Lysergsäuregehalt die Menge der rechtsdrehenden Alkaloide (sowohl in der Ergotamin- als auch in der Ergotoxingruppe) ebenfalls beträchtlich ist. Alle diese Zersetzungs- bzw. Isomerisationsvorgänge wären demnach nicht der Extraktion zuzuschreiben, sondern sollten als Lagerungsschäden bezeichnet werden. Es sollen bisweilen sogar frische Drogen vorgefunden worden sein, die neben den intakten Alkaloiden noch deren Zersetzungsprodukte enthielten. Auf jeden Fall läßt die Menge der Lysergsäure schon ein grobes Urteil über das Verhältnis der links- bzw. rechtsdrehenden Alkaloide zu. Bei den Drogen Nr. 2 und 5, die wenig Lysergsäure enthalten, liegen sowohl in der Ergotamin- als auch in der

Ergotoxingruppe 75% der anwesenden Alkaloide noch in der linksdrehenden Form vor, bei den anderen drei Drogen, deren Lysergsäuregehalt zwischen 5,6 und 9,7% liegt, wurden über 50% Alkaloide in rechtsdrehender Form vorgefunden. Werden solche Drogen zum Zwecke der Alkaloidgewinnung einer Extraktion unterworfen, so kann in diesem Falle nur ein Produkt schlechter Qualität erwartet werden, denn beim Extraktionsvorgang muß mit der Isomerisation eines weiteren Anteiles der noch erhaltenen linksdrehenden Alkaloide gerechnet werden.

An Hand der angeführten Beispiele sollte nicht nur die Anwendbarkeit unserer Methode zur quantitativen Bestimmung der Einzelalkaloide im Mutterkorn, sondern auch die dringende Notwendigkeit solcher Analysen gezeigt werden, da nur auf diesem Wege eine sichere Entscheidung möglich ist, ob eine Droge zur Herstellung eines therapeutisch wirksamen Extraktes oder Präparates geeignet ist. Die Resultate dieser Analysen zeigen die Zusammensetzung des Alkaloidanteiles einiger Drogen jugoslawischer Herkunft aus der Umgebung von Zagreb. Die Mehrzahl der Drogen enthält Alkaloide der Ergotamin- und Ergotoxingruppe nebeneinander, nur eine der analysierten Drogen könnte als mehr oder weniger reine Ergotamindroge bezeichnet werden.

Dem Vorstand des Institutes, Frau Prof. Dr. Ing. *M. Perpar*, die die Anregung für diese Arbeit gegeben hat und sie mit nutzvollen Ratschlägen unterstützte, bin ich zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

Zusammenfassung

Es wird die Anwendbarkeit der seinerzeit ausgearbeiteten Methode zur quantitativen papierchromatographischen Bestimmung einzelner wasserunlöslicher Mutterkornalkaloide für die Bewertung einer Droge gezeigt. Nach dieser Methode wurden fünf Mutterkornsorten jugoslawischer Herkunft analysiert. Die analysierten Drogen enthalten Alkaloide der Ergotamin- und Ergotoxingruppe nebeneinander, eine dieser Drogen könnte als mehr oder weniger reine Ergotamindroge bezeichnet werden. Der Lysergsäuregehalt allein läßt schon im voraus auf die Menge der vorliegenden rechtsdrehenden Alkaloide schließen. Eine Zersetzung der Alkaloide bis zur Lysergsäure bzw. die Umlagerung in optisch rechtsdrehende, physiologisch inaktive Form muß einer schlechten Lagerung der Droge zugeschrieben werden und ist nicht durch den Extraktionsvorgang bedingt.

Summary

The applicability of the method developed at the time for the quantitative paper chromatographic determination of individual water-insoluble ergot alkaloids for the evaluation of drug is shown. This method was used to analyze five ergot varieties of Jugoslavian origin. The analyzed drugs contain

alkaloids of both the ergotamin- and ergotoxin groups; one of these drugs could be designated as more or less pure ergotamin drug. The lysergic acid content alone permits an advance conclusion regarding the quantity of dextro rotatory alkaloids present. A decomposition of the alkaloids as far as lysergic acid or the rearrangement into the optically dextro rotating physiologically inactive form must be ascribed to a poor storing of the drug and is not dependent on the extraction process.

Résumé

L'auteur montre la possibilité d'application de la méthode qu'il a antérieurement mise au point pour la détermination quantitative par chromatographie sur papier des alcaloïdes de l'ergot de seigle insolubles dans l'eau, à l'étude de la valeur d'une drogue. A l'aide de cette méthode on a analysé 5 sortes d'alcaloïdes de l'ergot de seigle d'origine yougoslave. Les drogues analysées contenaient simultanément des alcaloïdes des groupes de l'ergotamine et de l'ergotoxine sauf l'une d'entre elles qui était à base d'ergotamine plus ou moins pure. La teneur en acide lysergique seule permet déjà de prévoir la quantité des alcaloïdes dextrogyres présents. Une décomposition des alcaloïdes en acide lysergique ou leur transposition en forme dextrogyre physiologiquement inactive doit être attribuée à un mauvais magasinage de la drogue et non pas au processus d'extraction.

Literatur

[1] *J. Kolšek*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 1500.

Département de Microchimie de l'Université Libre de Bruxelles

Ultra microméthodes nouvelles de dosage direct du zinc sur papier

Par

A. Lacourt et P. Heyndryckx

Avec 5 Figures

(Reçu le 22 mai 1956)

La notion que le zinc est un oligoélément, jouant un rôle physiologique important, est assez récente. Pour les plantes, 1/100000 entraine la mort tandis que le 1/1000000 est inoffensif, mais la résistance varie selon les espèces. Chez les animaux (rats et souris) 2 mg de zinc pour 100 g d'animal est une quantité qui est favorable à la vie. Souvent l'action physiologique est couplée avec une présence de vitamine B_1 et B_2 ou d'autres substances organiques. Des quantités de l'ordre de 1/10000000 introduites dans des cultures d'aspergillus niger en favorise la croissance et ce, jusqu'à concurrence de 1/1000. Une quantité de zinc supérieure devient toxique. L'absence de zinc dans le sol provoque des carences et des maladies de carence chez les plantes, les animaux et l'homme. Un apport journalier de zinc dans la ration alimentaire des êtres vivants est nécessaire et comme les chiffres ci dessus le démontrent, les quantités efficaces sont extrêmement petites. Les agronomes, les biochimistes, les vétérinaires que cette question intéresse, doivent pour tirer des conclusions valables de leurs observations de sélection, de rendement, de carence, examiner de très nombreux individus et disposer d'un outillage analytique adéquat dans ce but. Les différences dans les résultats enregistrés, doivent être directement liées aux différences dans les teneurs réelles en zinc des échantillons examinés, c'est-à-dire que les erreurs de dosage doivent être négligeables par rapport aux différences de zinc à mettre en évidence. Il y a en outre à considérer que ces minimes quantités de zinc à doser sont accompagnées de traces d'autres oligoéléments et que ceux-ci interfèrent fréquemment dans les dosages.

Pour toutes ces raisons, une ultra microméthode de dosage du zinc, adéquate pour le genre de recherche envisagée, doit être rapide, sensible, reproductible et de préférence s'adresser au zinc isolé par chromatographie. C'est en effet la seule technique de séparation qui est automatique et quantitative lorsqu'elle est mise au point.

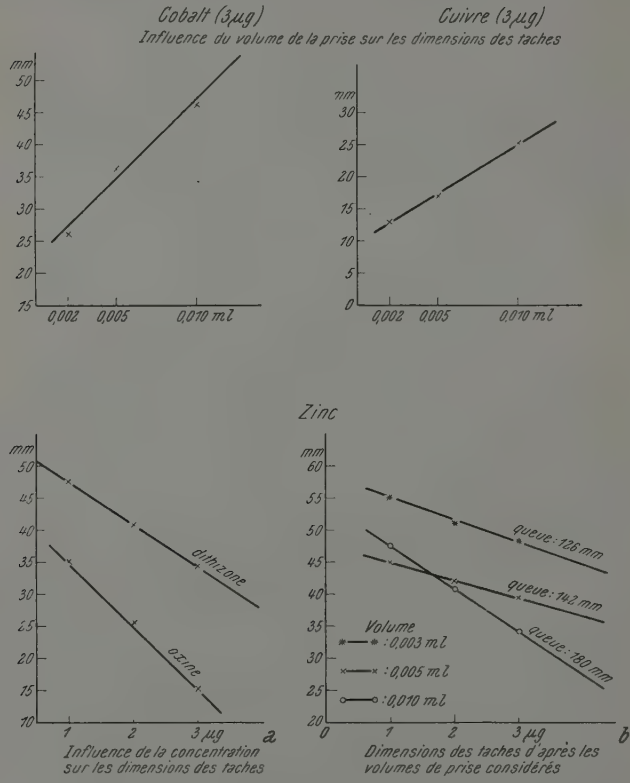

Fig. 1. Facteurs d'influence sur les dimensions et la position des taches chromatographiées

Nous savons déjà que le zinc est un élément qui migre facilement par chromatographie sur papier. Les R_f donnés par *Pollard*[1] sont tous élevés quels que soient les développants employés. Nous avons déjà signalé que l'eau de la prise[2], selon que cette dernière est développée humide ou sèche, peut jouer un rôle dans l'emplacement de la tache de zinc. Il n'est donc pas étonnant que dans les expériences de chromatographie quanti-

tative que nous avons poursuivies ici, nous ayons mis en évidence un effet de la grandeur de la prise sur l'emplacement et les dimensions des taches. Il n'est pas surprenant non plus que les taches changent de forme, de dimension et de position avec le conditionnement en humidité du papier chromatographique et du solvant. Ces facteurs d'interférence ont été étudiés ici, au cours de ce travail, de telle manière à les utiliser au profit d'une amélioration dans la séparation quantitative et dans la mesure directe des taches ainsi obtenues. Nous n'observons pas de proportionnalité entre les volumes des prises et les dimensions des taches chromatographiées comme c'était le cas pour les taches de cobalt et de cuivre étudiées antérieurement[3].

Tableau I. Influence du volume de la prise sur les dimensions des taches chromatographiées de zinc (Fig. 1*b*)

Volume de la prise en ml	Mesures des taches à partir du sommet de la bandelette en mm	Longueur des taches en mm
0,003	122—170/125—175	48/50
	125—175	50
0,005	140—175/139—176	35/37
	138—176/138—179	38/41
0,010	177—211/179—212	34/33
	176—209	33

Tous les essais ont été faits en prenant une concentration en zinc de 3 μg. Les révélations sont faites à la dithizone.

Mais il est intéressant de noter ce que deviennent les dimensions des taches de zinc chromatographié lorsque le volume de prise et la concentration de la solution changent.

Tableau II. Influence du volume des prises et des changements de concentration sur les dimensions des taches chromatographiées

Concentration en zinc en μg	Longueur des taches en mm (moyennes) pour des volumes de prises en ml		
	0,010	0,005	0,003
3	34	39	48
2	41	42	51
1	47	45	55

Toutefois, *l'emplacement* de la tache est influencé par le volume de la prise. C'est surtout sur la queue de la tache que l'effet se fait sentir le plus nettement. Nous donnons ci-après les résultats, obtenus en révélant les taches à la dithizone. A cause de cette proportionnalité, il est

possible de choisir le volume de la prise de telle manière que la tache se place à un endroit du chromatogramme le plus favorable. Cette action est indépendante de la concentration de la prise qui agit uniquement sur les dimensions des taches, comme nous le verrons plus loin.

Tableau III. Influence du volume de la prise sur l'emplacement de la queue de la tache (Fig. 1*b*)

Volume de la prise en ml	Emplacement de la queue de tache (en mm) (révélat. dithizone)	Moyenne à porter sur le diagramme (en mm)
0,002	118/118/113 118/118/117	117
0,003	123/127/122 125/122/125 130/130/122 131	126
0,005	140/145/143 140/142/140	142
0,010	180/181/178 180/180/179	180

On note aussi une proportionnalité très nette entre la concentration et les dimensions des taches chromatographiées, comme l'indique le tableau IV.

Par analogie avec le cobalt et le cuivre, nous adoptons un volume de 0,010 ml pour étudier les diverses concentrations en zinc. De plus, nous étudierons les dimensions des taches pour les deux modes de révélation: à *l'oxine acétique* et à *la dithizone.*

Les taches sont mesurées après chromatographie et donnent les résultats indiqués dans le tableau V.

Tableau IV. Influence de la concentration en zinc sur les dimensions des taches chromatographiées

Concentration en zinc en μg	Mesure des taches à partir du sommet de la bandelette (en mm)	Longueur des taches en mm	Réactif révélateur (Fig. 1 *a*)
3	171—186/175—190	15/15	Oxine acétique
	177—211/178—211	34/33	Dithizone
2	177—201/176—203	24/27	Oxine acétique
	178—218/175—220	40/45	Dithizone
1	175—210/176—212	35/36	Oxine acétique
	172—218/170—217	46/47	Dithizone

Une grande différence existe dans les dimensions des taches chromatographiées, selon qu'elles sont révélées à l'oxine acétique ou à la dithizone. Ceci est confirmé ci-après:

Tableau V. Influence du réactif révélateur sur la dimension des taches de zinc chromatographiées

Etude du zinc chromatographié d'un mélange contenant du cobalt et du cuivre ($CoCl_2 \cdot 6\,H_2O$—$CuCl_2 \cdot 2\,H_2O$—$ZnCl_2$ — 50% acide chlorhydrique *v/v*)

Conc. du zinc en μg	Volume de la prise en ml	Mesure des taches à partir du sommet de la bandelette (en mm)	Longueur des taches en mm	Réactif révélateur
3	0,003	130—163/130—155	33/25	Oxine acétique
		122—170/131—164	48/33	Dithizone
3	0,010	171—186/175—190	15/15	Oxine acétique
		177—211	34	Dithizone
2	0,010	177—201/176—203	24/27	Oxine acétique
		178—218/175—220	40/45	Dithizone

Ceci est en relation directe avec la sensibilité de détection beaucoup plus grande de la dithizone (limite pour la dithizone sur papier 0,025 μg) servant à la révélation.

On peut donc résumer ces différents facteurs d'interférence, actifs sur la migration du zinc comme suit:

Tableau VI

Volume de prise Dimension des taches	Volume de prise Emplacement des taches	Concentration Dimension des taches	Concentration Emplacement des taches
aucune proportion.	proportionnalité Fig. 1*b*	proportionnalité Fig. 1*a*	aucune influence

Ces mêmes facteurs ont des incidences très différentes sur les migrations du cobalt[3] et du cuivre[4], comme on peut en juger dans le tableau VII et la Figure 1:

Tableau VII. Incidence des facteurs d'interférence sur les migrations du cobalt et du cuivre chromatographiés (Fig. 1)

Elément	Volume de prise Dimension des taches	Volume de prise Emplacement des taches	Concentration Dimension des taches	Concentration Emplacement des taches
Cobalt	proportionnalité	—	aucune influence	—
Cuivre	bonne proportionnalité	—	faible influence	—

On est ainsi amené à dire que l'étude des conditions chromatographiques sur papier de solutions globales peut difficilement conduire à des résultats parfaites, si elle n'est pas précédée d'une étude sur l'élément en solution. Le comportement des individus en solution, peut être influencé par la présence d'autres éléments, aussi est-il nécessaire pour aboutir à des conditions standard de trouver des compromis entre les conditions des migrations individuelles.

Les conclusions auxquelles nous arrivons dans ce domaine ne sont évidemment valables que dans le cas de chromatographie dans les conditions déjà publiées[5] de solutions simples de zinc ou de mélanges contenant à côté du zinc, du cuivre et du cobalt.

A ce sujet, nous rappelons brièvement que le *saturant* des cuves chromatographiques est de la *méthyléthylcétone* fraîchement distillée, que le *développant* est également de la méthyléthylcétone mais que celle-ci est placée dans la cuve pendant la saturation de manière à subir une contamination par l'atmosphère de cette enceinte. La cuve contient en outre un *contaminant* qui n'est autre que de la méthyléthylcétone humidifiée d'une certaine façon.

La séparation est quantitative lorsqu'elle est effectuée sur papier conditionné à 52% d'humidité. Tandis que ce taux d'humidité donne de belles taches de cuivre et de cobalt, elles donnent des taches mal formées pour le zinc. Lorsque le papier est conditionné à 76% d'humidité, les taches de zinc sont plus petites, et plus favorables donc à leur mesure, mais la séparation cobalt/cuivre est moins bonne.

La détection du zinc sur un tel chromatogramme est très facile, une fois l'élément isolé, par l'un des réactifs préconisés par *Feigl*[6] et jusqu'à 0,025 μg par la dithizone.

Deux ultra microtechniques de dosage direct du zinc ont été étudiées ici: la *titrimétrie* et la *spectrophotométrie*.

La *titrimétrie* et la *spectrophotométrie sur papier* dosent sur place les quantités telles qu'elles sont, sans déplacement et sans dilution, donc avec le minimum de manipulation et le gain de temps maximum. Pour atteindre la précision désirée, il a été nécessaire de se débarasser des effets perturbants du papier, obstacle de base à l'obtention d'une bonne reproductibilité. Le manque d'homogénéité du papier apparaît surtout lorsque l'on compare photométriquement millimètre après millimètre l'opacité des différentes zones d'une bandelette. Lorsque la comparaison a lieu sur une surface de l'importance d'une fenêtre de cuvette spectrophotométrique, ces surfaces prises à des niveaux différents d'une même bandelette ou dans des bandelettes différentes accusent des propriétés optiques assez semblables, pourvu que l'on se place pour les mesurer dans des conditions standard. C'est la recherche de ces conditions standard

qui va faire l'objet des mises au point qui vont suivre. Nous ajouterons que ces dosages sont destinés à déterminer sur papier la concentration de solutions de zinc.

Le zinc se dose bien s'il est ou non chromatographié sur papier et nous avons pu constater ici encore que la reproductibilité des résultats est meilleure dans le cas de taches chromatographiées.

D'autre part, ce dosage étant mis au point pour doser le zinc de solution contenant également du cobalt et du cuivre qui interfèrent, le fait de pouvoir doser cet élément de manière satisfaisante, *seul* après séparation chromatographique augmente la valeur pratique de ces dosages et répond à un besoin urgent de telles ultramicrométhodes dans divers domaines — comme il a été précisé au début.

I. Titrage direct sur papier du zinc par le complexon III *M*/100

On titre par le complexon III *M*/100, en présence de *deux* témoins:

1° contenant 10 μg de zinc, 6 gouttes de tampon et 8 gouttes d'indicateur. La coloration développée est *violette*.

2° contenant 10 μg de zinc, 6 gouttes de tampon et 8 gouttes d'indicateur, titré par le complexon III *M*/100 jusqu'à obtention d'une coloration *bleue*.

Il faut avoir soin de refaire de temps en temps le témoin au cours du titrage car le virage est assez difficile à saisir.

Réactifs:

1° Tampon ammoniacal de chlorure d'ammonium: 29 ml NH_4OH à 29,6% NH_3, 5,4 g NH_4Cl; porter le tout à 100 ml au moyen d'H_2O bidistillée.

2° Noir d'ériochrome fraîchement préparé: 100 mg de noir d'ériochrome + NaCl solide (1/200) + 1,2 ml H_2O bidistillée + 1 goutte de tampon.

3° 5 ml H_2O bidistilleé.

Nous avons étudié successivement:

A. Le titrage *du zinc en solution*[7] pour des concentrations de 5—7—10 μg.

B. Le titrage *du zinc seul chromatographie* pour des concentrations de 5—7—10 μg.

C. Le titrage *du zinc séparé par chromatographie* d'une *solution contenant du cuivre et du cobalt*. Les concentrations de zinc étudiées sont 5—7—10 μg.

Lorsqu'il s'agit de doser du zinc chromatographié, il faut réaliser des témoins avec une longueur de papier filtre de même dimension que dans l'analyse. Ces papiers portant une goutte de solution de base, sont au préalable chromatographiés.

A. Titrage du zinc en solution par le complexon III M/100

Tableau VIII

Concentration de la solution de chlorure de zinc 50% *v/v* acide chlorhydrique: 10 μg par 0,01 ml

Prise de zinc en μg	Quantité de complexon III Consommée (en ml)	Ecarts %
10	0,0213/0,0200/0,0199	+ 6,5/0/— 0,5
	0,0202/0,0199/0,0198	+ 1,0/— 0,5/— 1,0
	0,0200/0,0199/0,0200	0/— 0,5/0
	0,0200	0
	M/10: 0,0200	
7	0,0150/0,0145/0,0135	+ 3,0/0/— 7,4
	0,0150/0,0140/0,0140	+ 3,6/— 3,6/— 3,6
	0,0145/0,0155/0,0145	0/+ 7,4/0
	0,0145	0
	M/10: 0,0145	
5	0,0100/0,0095/0,0090	+ 3,0/— 1,9/— 7,7
	0,0088/0,0092/0,0100	— 10,0/— 4,5/+ 3,0
	0,0100/0,0100/0,0099	+ 3,0/+ 3,0/+ 2,0
	0,0099	+ 2,0
	M/10: 0,0097	

B. Titrage du zinc chromatographié sur papier par le complexon III M/100

Tableau IX

Concentration de la solution de chlorure de zinc 50% *v/v* acide chlorhydrique: 10 μg par 0,01 ml — Longueur de la bandelette de papier titré: 10 cm — Blanc papier en ml de complexon III *M*/100: 0,068 et 0,062 ml

Prise de zinc en μg	Quantité de complexon III consommée (en ml) corrigée	Ecarts %
10	0,0400/0,0420/0,0430	— 5,0/0/+ 2,5
	0,0400/0,0440	— 5,0/+ 5,0
	M/5: 0,0420	
7	0,0245/0,0215/0,0225	+ 10,0/— 5,0/— 0,5
	0,0220/0,0225	— 3,0/— 0,5
	M/5: 0,0226	
5	0,0110/0,0110/0,0100	0/0/— 9,5
	0,0110/0,0099	0/— 10,0
	M/5: 0,0106	

Les points représentatifs de ces titrages donnent lieu à un diagramme acceptable pour les valeurs envisagées (Fig. 2).

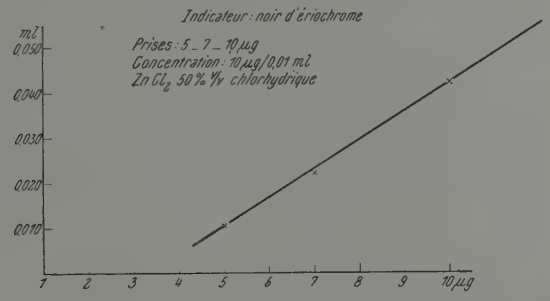

Fig. 2. Titrage du zinc chromatographié par le complexon III M/100

C. Titrage du zinc chromatographié sur papier séparé du cobalt et du cuivre par le complexon III M/100

Tableau X

Concentration de la solution ($CoCl_2 \cdot 6\,H_2O + CuCl_2 \cdot 2\,H_2O + ZnCl_2$) 50% *v/v* acide chlorhydrique — 10 µg de chaque élément par 0,01 ml — Longueur de la bandelette titrée: 10 cm — Blanc papier en ml de complexon III *M*/100: 0,068 et 0,062 ml

Prise de zinc en µg	Quantité de complexon III consommée (en ml) corrigée	Ecarts %
7	0,0220/0,0210/0,0215	+ 0,20/— 0,30/— 0,05
	0,0220/0,0215	+ 0,20/— 0,05
	M/5: 0,0216	
5	0,0110/0,0090/0,0100	+ 0,10/— 0,10/0
	0,0110/0,0100	+ 0,10/0
	M/5: 0,0100	

Le titrage du zinc chromatographié donne lieu à un blanc considérable, ce qui limite la sensibilité de la technique.

Pour les buts poursuivis, il s'avère que cette méthode de titrage directe, tout en étant une ultra micro méthode, ne permet pas de descendre assez bas dans l'échelle des grandeurs et qu'elle n'a donc pas une finesse suffisante. C'est pourquoi nous nous sommes adressées à la spectrophotométrie directe qui nous a déjà bien réussi précédemment dans les cas des dosages de cobalt et de cuivre.

II. Spectrophotométrie directe du zinc sur papier

Antérieurement déjà nous avons décrit ce procédé de dosage[3, 8]: Un volume connu de solution à analyser est déposé sur le papier. Après traitement approprié, le zinc est révélé à la dithizone. Lorsque la tache est bien colorée, elle est placée en face de la fenêtre dans une cuvette Beckman de 1 cm, à l'intérieur, entre la parois et le piston de verre transparent calibré. La transmission de la lumière au travers de la tache est mesurée dans l'eau (qui ne dissout ni le complexe ni le réactif) à une longueur d'onde définie (520 mμ). Le zéro de densité optique du Beckman est ajusté sur le blanc papier vaporisé à la dithizone, qui est très stable.

Conditionnement du papier

En ce qui concerne *le conditionnement du papier*, une petite mise au point s'impose avant de décrire le procédé de révélation du complexe. La *chromatographie quantitative* du cobalt, du cuivre et du zinc a été étudiée sur du papier Whatman n° 4, conditionné à 52% d'humidité[5]. A ce moment, on a remarqué que le papier conditionné à 76% d'humidité donne des taches chromatographiées plus petites et mieux formées, donc convenant mieux à la spectrophotométrie.

Le papier à 76% d'humidité sera donc utilisé ici pour l'étude de la spectrophotométrie directe sur papier des taches de zinc révélées à la dithizone.

Mode de révélation des taches à la dithizone

Le procédé de révélation du complexe est le suivant: La prise de zinc est faite sur du papier ruban conditionné à 76% d'humidité, séchée à la lampe infra-rouge pendant 10 minutes et vaporisé ensuite avec une *solution tampon* dont la composition est la suivante: on prépare pour *chaque série d'expériences* de l'acétate d'ammonium molaire frais à partir d'acide acétique glacial et d'ammoniaque concentré (la neutralisation se fait dans la glace). On ajoute à cet acétate d'ammonium une quantité égale en volume, d'acide acétique; vaporise la bandelette avec ce mélange. On sèche la bandelette pendant 15 minutes et la vaporise ensuite avec le réactif dithizone dissous dans le tétrachlorure de carbone. La concentration de la dithizone dans le tétrachlorure est de 15 mg%. On sèche la bandelette pendant 15 minutes à l'infra rouge et fait la mesure au spectrophotomètre Beckman 30 minutes après la révélation.

Etude du vieillissement du complexe zinc-dithizone sur papier

L'attente de 30 minutes après révélation des taches a été établie par l'étude de leur vieillissement au photomètre à lumière blanche. Nous

donnons ci-après les surfaces planimétrées en mm² après 30, 60 et 90 minutes de révélation et pour une concentration en zinc de 3 μg (Fig. 3).

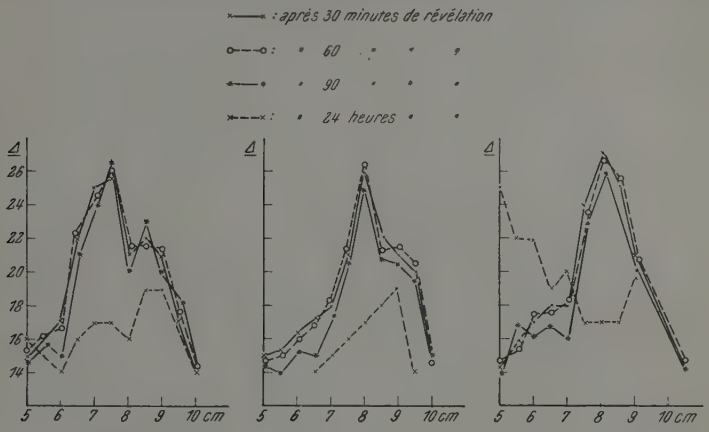

Fig. 3. Photométrie du zinc révélé à la dithizone (3 μg)

Tableau XI

N° de la bandelette	Minutes de révélation		
	30	60	90
	Surface planimétrée en mm²		
1	570	566	560
2	566	564	558
3	572	570	566

Après 24 heures, les taches ont fortement évolué: les résultats de dosage ne sont plus concordants.

Pour établir les diagrammes de référence dans le dosage du zinc non chromatographié et chromatographié par le complexe zinc-dithizone, nous étudierons la courbe d'absorption du complexe zinc-dithizone pour une concentration de 3 μg de zinc et une concentration en réactif de 15 mg%. D'après les données recueillies de cette manière, nous pouvons déduire les conditions expérimentales les plus favorables à l'établissement d'un diagramme de référence du complexe.

Le tableau XII nous permettra de tracer la courbe d'absorption du complexe entre 450 et 700 mμ.

Tableau XII. Mise au zéro de l'appareil sur le «blanc papier»

Spectrophotomètre Beckman — Lampe au tungstène — Phototube rouge — Cuvettes: 1 cm — Concentration du réactif: 15 mg% — Concentration du zinc: 3 μg

mμ	Fente mm	Valeurs de transmission pour 3 μg de zinc	
		I	II
450	0,52	105	99
460	0,48	102	95
470	0,44	99	93
480	0,40	92	90,3
490	0,36	88	87
500	0,34	87,5	87
510	0,32	86,3	86
520	0,28	85,7	85,5
530	0,26	86,3	86,1
540	0,24	89,1	89,0
550	0,22	91,3	91,0
560	0,21	91,2	91,1
570	0,20	95,8	95,3
580	0,18	97	96,8
590	0,17	101	100,8
600	0,16	106	105,5
625	0,14	110	110
650	0,12	110	110
700	0,09	110	110

Recherche du maximum d'absorption du complexe zinc-dithizone sur papier (Fig. 4)

D'après ces données, le maximum d'absorption du complexe se situe à 520 mμ les mesures pourront donc se faire à cette longueur d'onde avec une fente de 0,28 mm.

Jusqu'ici, les essais se font en présence d'un «blanc papier» établi comme 100% de transmission (le «blanc papier» est réalisé en plaçant la bandelette de papier blanc dans la cuvette en présence d'eau bidistillée). L'étape suivante étudie de plus près le *«blanc papier vaporisé»* (Blanc papier vaporisé au réactif et traité préalablement au tampon: ce blanc subit tous les traitement énumérés lors de la description du procédé de révélation du complexe. Il est mesuré aussi en présence d'eau bidistillée).

Etude du «blanc papier vaporisé»

Par comparaison avec un «blanc papier» on mesure trois bandelettes vaporisées auxquelles on a fait subir tous les traitements décrits précé-

demment et concernant la révélation du complexe zinc-dithizone. Les mesures se font dans l'eau bidistillée aussi bien pour le «blanc vaporisé» que pour le «blanc papier». La mise au zéro de l'appareil se fait sur ce «blanc papier».

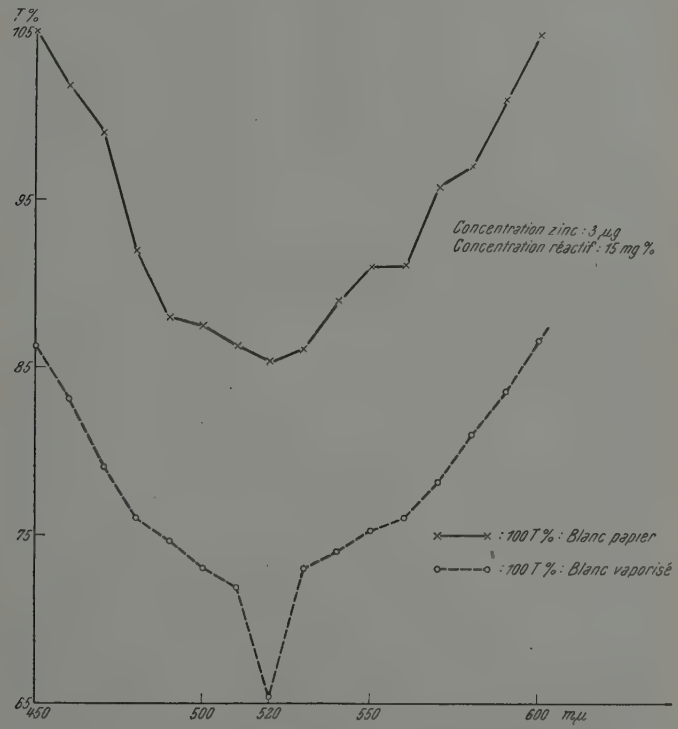

Fig. 4. Recherche du maximum d'absorption du complexe zinc-dithizone

Le tableau XIII tient compte des transmissions obtenues pour ces 3 bandelettes vaporisées.

Le «blanc papier vaporisé» présente une bonne reproductibilité de transmission aux diverses longueurs d'ondes envisagées.

Les valeurs obtenues de cette manière sont supérieures à celles du «blanc papier»: tout se passe comme si le papier traité par le tampon et le réactif étaient optiquement *moins dense*. Cette constatation peut nous permettre d'améliorer une nouvelle fois notre technique en ne passant plus par des intermédiaires pour les mesures

des taches de complexe. En effet, il suffira dans la suite du travail de mesurer *pour chaque série d'expériences* un «blanc papier vaporisé» (à savoir une bandelette révélée comme la bandelette portant la prise de zinc) et de tenir compte de la valeur de ce «blanc vaporisé» dans l'établissement de la valeur du complexe. Cette façon de procéder est possible à cause de la régularité de transmission de ces bandelettes vaporisées. Une courbe d'absorption du complexe sera dressée en tenant compte cette fois du «blanc papier vaporisé» pour la mise au zéro de l'appareil (Fig. 4). Un second avantage résulte de cette façon de procéder: en effet, nous bénéficions ainsi de 9 unités supplémentaires en pourcentage de transmission puisque les résultats obtenus pour les bandelettes vaporisées sont d'environ 9 unités supérieures à celle du blanc papier.

Tableau XIII

mμ	Fente mm	Bandelette vaporisée		
		I	II	III
480	0,40	109	110	109
490	0,36	109,9	110	109,8
500	0,34	109	109,3	109,2
510	0,32	109,1	109,2	109,2
520	0,28	109	109,2	109,1
530	0,26	109,2	109,3	109
540	0,24	109	109,1	109
550	0,22	109,1	109,3	109,2
560	0,21	109	109,1	109
570	0,20	109,2	109,3	109,2

Recherche du maximum d'absorption du complexe zinc-dithizone sur papier (Fig. 4)

En comparant les résultats obtenus ici avec ceux réunis dans le tableau XII, nous voyons que la mise au zéro de l'appareil sur un «blanc papier vaporisé» est beaucoup plus favorable que si l'on utilise le «blanc papier»: au maximum d'absorption, soit 520 mμ, le pourcentage de transmission est de 62,5% en moyenne alors qu'il était de 85,6% dans le cas d'une mise au zéro sur le «blanc papier».

Nous sommes maintenant en possession des conditions à adopter pour dresser les diagrammes de référence du complexe zinc-dithizone *non chromatographié* et *chromatographié*.

Nous utilisons la longueur d'onde de 520 mμ, la fente de 0,28 mm, la concentration en réactif de 15 mg%. La mise au zéro de l'appareil se fait sur le «blanc papier vaporisé».

Tableau XIV. Mise au zéro de l'appareil sur le «blanc papier vaporisé» (= Blanc Standard)

Spectrophotomètre Beckman — Lampe au tungstène — Phototube rouge — Cuvettes: 1 cm — Concentration du réactif: 15 mg — Concentration du zinc: 3 μg

mμ	Fente mm	Valeurs de transmission pour 3 μg de zinc		
		I	II	III
450	0,52	86,1	90,0	92,0
460	0,48	83,0	88,0	90,0
470	0,44	79,0	85,0	89,0
480	0,40	76,1	80,0	79,0
490	0,36	74,5	75,1	74,6
500	0,34	73,1	73,4	73,2
510	0,32	72,0	72,1	72,0
520	0,28	65,2	65,4	65,2
530	0,26	73,0	73,2	73,1
540	0,24	74,2	74,1	74,2
550	0,22	75,5	75,7	75,6
560	0,21	76,0	76,1	75,9
570	0,20	78,2	78,3	78,1
580	0,18	81,0	81,1	81,0
590	0,17	83,9	84,0	83,8
600	0,16	86,5	86,6	86,4
625	0,14	92,1	92,0	92,2
650	0,12	92,0	92,1	92,2
700	0,09	91,9	92,0	92,1

Diagramme de référence du zinc non chromatographié et chromatographié

La mise au zéro de l'appareil sur le «blanc papier vaporisé» présente le grand avantage de supprimer tous les calculs dans l'expression des résultats du complexe. En effet, il suffit de faire un «blanc papier vaporisé» avec chaque série d'expériences et de mettre l'appareil au zéro de densité optique sur cette bandelette pour avoir directement la valeur des densités optiques du complexe. Le tableau XV donne la valeur des densités optiques du complexe zinc-dithizone pour le zinc non chromatographié et chromatographié. La chromatographie du zinc se fait dans les conditions décrites antérieurement au début de cet article.

La bonne reproductibilité du «blanc papier vaporisé» a pour effet de permettre l'emploi de la méthode spectrophotométrique directe sur papier pour des taches chromatographiées autres que celles se trouvant au dépôt.

L'influence de la chromatographie sur les résultats du dosage sera étudiée dans le tableau XVI. Celui-ci groupera les valeurs des erreurs

quadratiques moyennes et des erreurs en pourcent pour diverses concentrations en zinc.

La reproductibilité des résultats servant à établir les diagrammes de référence du zinc non chromatographié et chromatographié est donnée ci-après. On se rend compte ainsi de l'influence favorable de la chromatographie sur les résultats de dosage obtenus pour diverses concentrations en zinc.

On constate que jusqu'à 0,1 μg la reproductibilité du dosage du zinc par ce procédé est remarquable et concurrence avantageusement toutes les méthodes de dosage pratiquées sur des solutions à cette échelle. Il n'est pas douteux que l'on puisse développer cette technique à un niveau *encore inférieur*.

Tableau XV. Diagramme de référence pour l'ultra micro spectrophotométrie directe du zinc sur papier

Complexe zinc-dithizone

Spectrophotomètre Beckman — Lampe au tungstène — Phototube rouge — Cuvettes: 1 cm — Longueur d'onde: 520 mμ — Fente 0,28 mm — Concentration du réactif: 15 mg% (Fig. 5)

Zinc non chromatographié

Unité de densité optique calculée	Ecarts à la moyenne	Unité de densité optique calculée	Ecarts à la moyenne
Concentration en zinc: 3 μg		Concentration en zinc: 1 μg	
0,185/0,184	—/— 0,0010	0,085/0,086	— 0,0005/+ 0,0005
0,185/0,186	—/+ 0,0010	0,086/0,084	+ 0,0005/— 0,0015
0,185/0,186	—/+ 0,0010	0,085/0,085	— 0,0005/— 0,0005
0,186/0,186	+ 0,0010/+ 0,0010	0,086/0,086	+ 0,0005/+ 0,0005
0,186/0,184	+ 0,0010/— 0,0010	0,085/0,086	— 0,0005/+ 0,0005
0,185/0,184	—/— 0,0010	0,085/0,086	— 0,0005/+ 0,0005
0,186/0,185	+ 0,0010/—	0,086/0,086	+ 0,0005/+ 0,0005
0,185/0,185	—/—	0,086/0,086	+ 0,0005/+ 0,0005
0,184/0,185	— 0,0010/—	0,086/0,085	+ 0,0005/— 0,0005
M/18: 0,1850		*M/18: 0,0855*	
Concentration en zinc: 2 μg		Concentration en zinc: 0,1 μg	
0,135/0,134	— 0,0001/— 0,0011	0,041/0,040	— 0,0001/— 0,0011
0,135/0,136	— 0,0001/+ 0,0009	0,041/0,040	— 0,0001/— 0,0011
0,136/0,135	+ 0,0009/— 0,0001	0,041/0,040	— 0,0001/— 0,0011
0,135/0,136	— 0,0001/+ 0,0009	0,041/0,040	— 0,0001/— 0,0011
0,135/0,134	— 0,0001/— 0,0011	0,041/0,040	— 0,0001/— 0,0011
0,134/0,135	— 0,0011/— 0,0001	0,039/0,040	— 0,0021/— 0,0011
0,135/0,135	— 0,0001/— 0,0001	0,040/0,041	— 0,0011/— 0,0001
0,136/0,136	+ 0,0009/+ 0,0009	0,041/0,042	— 0,0001/+ 0,0009
0,135/0,136	— 0,0001/+ 0,0009	0,041/0,041	— 0,0001/— 0,0001
M/18: 0,1351		*M/18: 0,0411*	

Zinc chromatographié

Unité de densité optique calculée	Ecarts à la moyenne	Unité de densité optique calculée	Ecarts à la moyenne
Concentration en zinc: 3 μg		Concentration en zinc: 1 μg	
0,201/0,200	+ 0,0006/— 0,0004	0,105/0,105	— 0,0005/— 0,0005
0,201/0,199	+ 0,0006/— 0,0014	0,106/0,106	+ 0,0005/+ 0,0005
0,200/0,201	— 0,0004/+ 0,0006	0,106/0,106	+ 0,0005/+ 0,0005
0,201/0,200	+ 0,0006/— 0,0004	0,105/0,106	— 0,0005/+ 0,0005
0,201/0,201	+ 0,0006/+ 0,0006	0,106/0,104	+ 0,0005/— 0,0015
0,201/0,200	+ 0,0006/— 0,0004	0,105/0,105	— 0,0005/— 0,0005
0,199/0,201	— 0,0014/+ 0,0006	0,105/0,106	— 0,0005/+ 0,0005
0,200/0,200	— 0,0004/— 0,0004	0,106/0,106	+ 0,0005/+ 0,0005
0,201/0,201	+ 0,0006/+ 0,0006	0,105/0,106	— 0,0005/+ 0,0005
M/18: 0,2004		*M/18: 0,1055*	
Concentration en zinc: 2 μg		Concentration en zinc: 0,1 μg	
0,153/0,154	— 0,0002/+ 0,0008	0,060/0,059	— 0,0006/— 0,0016
0,153/0,153	— 0,0002/— 0,0002	0,060/0,060	— 0,0006/— 0,0006
0,154/0,154	+ 0,0008/+ 0,0008	0,061/0,061	+ 0,0004/+ 0,0004
0,153/0,153	— 0,0002/— 0,0002	0,061/0,061	+ 0,0004/+ 0,0004
0,154/0,154	+ 0,0008/+ 0,0008	0,061/0,061	+ 0,0004/+ 0,0004
0,153/0,154	— 0,0002/+ 0,0008	0,060/0,061	+ 0,0006/+ 0,0004
0,153/0,153	— 0,0002/— 0,0002	0,062/0,061	+ 0,0014/+ 0,0004
0,153/0,152	— 0,0002/— 0,0012	0,061/0,060	+ 0,0004/— 0,0006
0,153/0,153	— 0,0002/— 0,0002	0,061/0,060	+ 0,0004/— 0,0006
M/18: 0,1532		*M/18: 0,0606*	

La chromatographie améliore une fois de plus les résultats et ceci pour toutes les concentrations en zinc. L'allure des diagrammes de référence est plus redressée que dans le cas du complexe cobalt α-nitroso β-naphtol. L'écart entre les valeurs de densité optique obtenues pour le zinc non chromatographié et le zinc chromatographié est plus accentué que dans le cas du complexe cuivre-acide rubéanique.

Tableau XVI. Reproductibilité des résultats de dosages spectrophotométriques directs du zinc non chromatographié et chromatographié

Conc. zinc en μg	Zinc non chromatographié		Zinc chromatographié	
	Erreur quadratique moyenne	Erreur %	Erreur quadratique moyenne	Erreur %
3	0,00024	0,13	0,00020	0,09
2	0,00022	0,16	0,00018	0,11
1	0,00050	0,58	0,00019	0,18
0,1	0,00028	0,68	0,00018	0,29

Conclusions

La présente mise au point intéresse la résolution de problèmes tant qualitatifs que quantitatifs ayant le zinc comme objectif, en particulier, lorsque celui-ci est accompagné d'autres éléments. Nous n'avons étudié ici, que le cas où il est accompagné du cobalt et du cuivre et ce, jusqu'à concurrence de proportions relatives de 1 à 500 d'un élément par rapport à l'autre. Afin d'échapper aux difficultés d'identification — dues aux interférences des autres ions, au p_H etc.[9] — une technique de séparation chromatographique de zinc sur papier Whatman N° 4 a été mise au point à l'échelle du microgramme. Pour obtenir de belles taches (en forme, dimensions et emplacement) représentant les 100% des quantités de départ, des facteurs d'interférence ont été étudiés (relativement au développant, au saturant, au contaminant, au conditionnement en humidité du papier, à la forme des bandelettes, au volume de la prise et à la concentration des solutions à analyser). Des normes à leur sujet ont été établies en contrôlant les résultats correspondant à chaque modification étudiée. Ce contrôle a été pratiqué par titrimétrie directe et spectrophotométrie directe. Les conditions standard de chromatographie ainsi établies livrent en 45 minutes la réponse quant à la présence ou l'absence du zinc dans la solution, et ce jusqu'à 0,1 μg d'élément, ce qui ne signifie nullement que ce soit là la limite inférieure de cette séparation. Comme telle, cette technique qualitative est appelée à rendre des services partout où est prédominant le rôle du zinc à l'état de trace, comme oligo-élément, ou comme élément biogène, là où il est important de le détecter (médecine, art vétérinaire, agronomie, biochimie, cytochimie, prospection géologique, géo-biochimie, géo-chimie etc.).

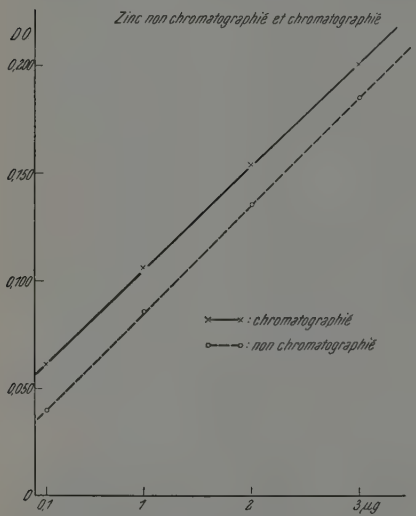

Fig. 5. Spectrophotométrie directe sur papier du complexe zinc-dithizone

Du point de vue quantitatif, le présent travail ne présente pas moins d'intérêt, en ce sens qu'il répond à une carence maintes fois exprimée en ce qui concerne une ultra microméthode de dosage de cet élément.

La séparation chromatographique n'est pas indispensable pour mettre en pratique les méthodes de dosage direct préconisées ici, pour autant que les éléments accompagnant le zinc n'interfèrent pas sur ces dosages. Il est toutefois important de souligner le fait que *la phase chromatographique améliore de façon sensible la reproductibilité*[8]. Nous n'avons donné la préférence qu'aux techniques exécutables directement sur papier et qui donnent d'excellents résultats jusqu'à 0,1 μg. On a spécialement mis au point la spectrophotométrie directe sur papier du complexe zinc-dithizone, de telle manière que la durée totale des manipulations — séparation comprise et dosage — n'excède pas deux heures pour huit déterminations. Pour des quantités de zinc variant de 3 à 0,1 μg la reproductibilité varie de 0,09 à 0,29%. Ce résultat n'a été atteint qu'après avoir étudié le vieillissement du complexe, les courbes d'absorption du réactif et du complexe, choisi la longueur d'onde la plus favorable au travail, c'est-à-dire celle donnant le plus grand écart en unités de densité optique entre l'absorption du complexe et celle du réactif. La part d'interférence du réactif vaporisé et celle du papier — support du complexe — ont été également mesurées. La reproductibilité spectrophotométrique des papiers vaporisés à la dithizone est telle que l'on peut se contenter de faire un seul blanc vaporisé standard par série de dosages et mettre le Beckman au zéro de densité optique sur ce blanc. On réduit sensiblement de cette manière le nombre et la durée des manipulations et les calculs préparatoires aux résultats finaux sans nuire ni à la reproductibilité ni à la sensibilité du dosage (0,010 u. d. o. est ainsi gagnée).

Les diagrammes de référence tracés selon cette technique sont en ligne droite et celui correspondant aux chromatographies se place plus haut que l'autre, démontrant ainsi graphiquement l'amélioration due à la chromatographie. Le dosage spectrophotométrique direct sur papier surpasse ceux effectués en solution par sa simplicité, sa rapidité, sa reproductibilité et la possibilité de descendre plus bas dans l'échelle des grandeurs à doser par suppression de l'élution et des dilutions. Le témoin qui subsiste après le dosage n'est plus mesurable ultérieurement comme c'est le cas pour le cobalt et le cuivre examinés précédemment. Nous avons la conviction que cette technique ultra microchimique de dosage direct sur papier portera ses fruits dans de nombreux domaines de recherches relatives au zinc.

Résumé

La mesure *directe sur papier* d'une concentration de chlorure de zinc peut se faire par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 520 mμ, en complexant cet élément à la dithizone. Le procédé standard de dosage décrit ici prévoit la mise au point du Beckman au zéro de densité optique sur *un seul blanc papier vaporisé* valable pour chaque série de 8 mesures. Cette technique économise du temps, réduit le nombre de manipulations

et fait gagner 0,010 U. D. O. La *reproductibilité* du dosage varie de 0,29 à 0,68% pour des quantités de zinc de l'ordre de 0,1 μg selon qu'il est ou non chromatographié. Huit dosages, chromatographie comprise, durent deux heures. L'amélioration des résultats par la chromatographie se vérifie ici une fois de plus. La *position* et la *grandeur* des *taches chromatographiées* peuvent être réglées à volonté, quelle que soit la concentration, grâce à une étude des facteurs d'influence.

Zusammenfassung

Die Bestimmung der Konzentration von Zinkchlorid kann spektrophotometrisch bei 520 mμ direkt auf Papier nach Komplexieren mit Dithizon ausgeführt werden. Nach dem hier beschriebenen Standardverfahren wird das Spektrophotometer (Beckman) unter Verwendung eines mit Dithizon vorbehandelten Papierstreifens als Blindprobe geeicht, wonach acht Messungen in Serie durchgeführt werden können. Die Reproduzierbarkeit der Bestimmung beträgt 0,29 bzw. 0,68% für die Größenordnung von 0,1 μg Zink, je nachdem, ob dieses vorher chromatographiert wurde oder nicht. Acht Bestimmungen dauern einschließlich der Chromatographie 2 Stunden. Es zeigte sich einmal mehr die Verbesserung der Ergebnisse durch die Chromatographie. Stellung und Größe der Chromatogrammflecken sind unabhängig von der Konzentration nach Belieben zu regeln, nachdem die darauf Einfluß nehmenden Faktoren untersucht wurden.

Summary

The direct measurement on paper of a concentration of zinc chloride may be accomplished by the spectrophotometer at the wave length 520 mμ by complexing this element with dithizone. The standard procedure of determination described here provides for adjusting the Beckman to zero of optical density on a single vaporized white paper valid for each series of 8 measurements. This technique saves time, reduces the number of manipulations, and gains 0.01 U. D. D. The reproducibility of the determination varies from 0.29 to 0.68% for amounts of zinc of the order of 0.1 μg depending on wether it is chromatographed or not. Eight determinations, chromatography included, require two hours. The improvement of the results by chromatography is once more verified. The position and the size of the spots on the chromatogram may be regulated at will, no matter what the concentration, thanks to a study of the influencing factors.

Bibliographie

[1] *F. H. Pollard* et *J. F. W. McOmie*, Chromatographic Methods of Inorganic Analysis. London: Butterworth. 1953.
[2] *A. Lacourt*, *G. Sommereyns* et *G. Wantier*, Analyst **77**, 921 (1952).
[3] *A. Lacourt* et *P. Heyndryckx*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 282.
[4] *A. Lacourt* et *P. Heyndryckx*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 1621.
[5] *A. Lacourt* et *P. Heyndryckx*, Mikrochim. Acta [Wien] **1954**, 630.
[6] *F. Feigl*, Spot Tests, 1er Vol. Amsterdam: Elsevier. 1954.
[7] *H. Flaschka*, Mikrochem. **39**, 38 (1952).
[8] *A. Lacourt*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 1211.
[9] *F. J. Welcher*, Organic Analytical Reagents. 3e Vol. New York. 1947, p. 526.
[10] *I. M. Kolthoff* et *E. B. Sandell*, Textbook of Quantitative Inorganic Analysis. London: Macmillan. 1950, p. 674.

Forschungsinstitut für Pharmazie und Biochemie, Prag, ČSR.

Verwendung des thermischen Zersetzungsproduktes von Silberpermanganat in der organischen Elementaranalyse

Von

J. Körbl

Mit 8 Abbildungen

(Eingelangt am 28. Mai 1956)

Fast alle Methoden der organischen Elementaranalyse setzen eine vollkommene Zerstörung des organischen Stoffes voraus. Diese Aufgabe wird meistens durch die Verbrennung des Stoffes gelöst. Schon seit der Zeit *Liebigs*, des Begründers der Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung, wird zu diesem Zwecke Kupferoxyd als Oxydationskatalysator verwendet. Verhältnismäßig viel später wendeten einzelne Autoren ihre Aufmerksamkeit anderen, analytisch verwendbaren Verbrennungsmöglichkeiten zu. Seit Anfang dieses Jahrhunderts ist das *Dennstedt*sche Prinzip[1] bekannt, das die kontaktkatalytischen Eigenschaften des blanken Platins ausnützt. Es fehlte auch nicht an Versuchen, das Kupferoxyd der *Liebig*schen Füllung durch andere Stoffe zu ersetzen. Von den bekanntesten seien hier Mangandioxyd[2], Vinosit B[3], Cerdioxyd[4], Silbervanadat[4] und Chromsesquioxyd[5] genannt. Mit Rücksicht auf die Gefahr, mit der Verbrennungsrohrfüllung eine Fehlerquelle in die Methode einzuschleppen, verzichteten andere Verfasser[6,7] überhaupt auf jeden Oxydationskatalysator, was zur Entwicklung der Methode des „leeren Rohres" geführt hatte, die in neuerer Zeit durch die Arbeiten von *Belcher* und *Ingram*[8–10] ziemlich weite Verbreitung fand.

Vor etwa drei Jahren begannen wir unsere Versuche mit einem neuen Oxydationskatalysator, dem thermischen Zersetzungsprodukt des Silberpermanganates[11]. Die Ergebnisse, die hauptsächlich auf dem Gebiete der Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung[12–15] erzielt wurden, waren so überraschend gut, daß die neue Methode binnen kurzer Zeit fast an allen tschechoslowakischen Arbeitsstätten eingeführt wurde. Es wurde auch die Möglichkeit einer Bestimmung des verbrennbaren Schwefels[16] studiert, bei der wir sowohl die oxydationskatalytischen als auch die Absorptionseigenschaften des Zersetzungsproduktes von Silberpermanganat auszunützen versuchten. Außerdem wurde eine qualitative Nachweismethode für eine Reihe von Elementen in organischen Verbindungen

ausgearbeitet[17]. Die thermische Zersetzung des Silberpermanganats wurde eingehendem Studium[18] unterzogen, auf Grund dessen wir glauben, die Erklärung der oxydationskatalytischen Eigenschaften dieses Zersetzungsproduktes gefunden zu haben.

Über die Zersetzung des Silberpermanganates und die Möglichkeit der Ausnützung seines Zersetzungsproduktes für die organische Analyse wird im folgenden kurz berichtet.

Darstellung des Silberpermanganates[11]

Es bewährte sich folgende Arbeitsvorschrift:

Man löst 194 g Kaliumpermanganat in der Siedehitze in 4 l Wasser und versetzt die Lösung mit 204 g Silbernitrat. Nach dem Auflösen wird die Lösung der Kristallisation überlassen. Das rohe Produkt wird auf einer Glasnutsche abgesaugt, mit 1,5 l Wasser ausgewaschen und aus 4 l Wasser umgelöst. Da sich die konz. Lösung des Silberpermanganates in der Siedehitze langsam zersetzt, empfiehlt es sich, das rohe Produkt in vorerhitztes Wasser einzutragen. Nach dem Auflösen wird durch eine Glasnutsche rasch filtriert, die ausgeschiedenen Kristalle mit dest. Wasser ausgewaschen und bei 60 bis 70° getrocknet. Ausbeute etwa 188 g.

Zersetzung des Silberpermanganates[11]

Diese verläuft spontan unter Verpuffung bei etwa 150°. Vorzugsweise arbeitet man mit kleinen Portionen (2 g) in einem Reagensglas. Es bildet sich eine schwarze, graphitähnliche, röntgenamorphe, wasserunlösliche Masse, die vorzüglich gasdurchlässig ist, so daß sich jede Granulation erübrigt. Für die Füllung des Verbrennungsrohres wird das 1 bis 3 Stunden bei 500° geglühte Produkt verwendet.

Die Arbeiten[19–22], die sich bisher mit der Zusammensetzung des thermischen Zersetzungsproduktes von Silberpermanganat befaßten, brachten kein klares Licht in dieses Problem. Unter Zuhilfenahme der thermischen Gewichts- und Differenzialanalyse, Leitfähigkeits- und Kontraktionsmessungen in einem Temperaturbereich bis zu 1000° gelangten wir zu folgenden Erkenntnissen[18]:

Durch die erste, spontane, exotherme Zersetzung, die bei 150° verläuft, entsteht eine molekulare Dispersion des Silberoxyds und Mangandioxyds, die größtenteils zu Silberpermanganit verbunden sind. Die Masse enthält jedoch immer mehr Sauerstoff, als der Formel $Ag_2O \cdot MnO_2$ entspricht. Dieser „Mehr-Sauerstoff" ist größtenteils mechanisch gelöst (inaktiver Sauerstoff nach *Gorgeu*[19]), Spuren sind als Manganatanion gebunden und der Rest, der für die p-Halbleitfähigkeit dieses Produktes verantwortlich ist, ist in den Interstitialräumen des Gitters angelagert. Bei der kontinuierlichen Erhöhung der Temperatur entweichen zuerst

der gelöste, am schwächsten gebundene Sauerstoff und die übrigen Formen des „Mehr-Sauerstoffes". Bevor diese Reaktionsfolge zu Ende verläuft, setzt die endotherme Zersetzung des Silberoxydes und Silberpermanganites ein, die bei etwa 480° beendet ist. Während dieser Zersetzung wechselt der Halbleitercharakter der Masse, die nun der Zusammensetzung $AgMnO_2$ entspricht und immer noch röntgenamorph ist, in einen n-Typ. Die Zusammensetzung $AgMnO_2$ bleibt bis zu 790° erhalten. Bei dieser Temperatur tritt weitere Zersetzung zu Silber und Mangansesquioxyd ein, das bei 960° unter gleichzeitigem Schmelzen des Silbers in Mn_3O_4 übergeht. Die Kurve der thermischen Differenzialanalyse zeigt noch ein Minimum bei 630°, das mit einer Kontraktion, mit raschem Abfall der Halbleitereigenschaften, an deren Stelle Metallleitfähigkeit tritt, jedoch mit keiner Gewichtsänderung verbunden ist.

Das bei 500° ausgeglühte Produkt kann entweder als ein atomares Gemisch von metallischem Silber mit Mangandioxyd oder als Silbermanganit angesehen werden. Wir halten die erste Möglichkeit für wahrscheinlicher. Der Unterschied besteht jedoch nur in der Anteiligkeit des Valenzelektrons des Silbers entweder zum Silberatom oder zum Mangandioxydmolekül. Infolge der Elektronenbeweglichkeit (die ihrerseits zum n-Halbleitercharakter führt) verliert diese Unterscheidung bei der hohen Temperatur ihren Sinn. Die oxydationskatalytischen Eigenschaften des auf 500° erhitzten Zersetzungsproduktes von Silberpermanganat im Temperaturbereich von etwa 450° (und für manche Stoffe noch niedriger) bis 600° sind auf Grund der Halbleitertheorie der Katalysatoren[23,24] leicht verständlich. Das atomar dispergierte Silbermetall stellt, wie bereits angedeutet, einen Elektronendonator dar. Die freiwerdenden Elektronen sammeln sich an den aktiven Zentren der Oberfläche des Katalysators, wo sie die Ionenbindung des adsorbierten Sauerstoffes vermitteln. Die auf diese Weise aktivierten Sauerstoffatome besitzen dann außerordentlich großes Oxydationsvermögen gegenüber den gleichzeitig adsorbierten organischen Molekülen.

Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung

Durch die Einführung des im Inneren rippenförmig geteilten Quarzverbrennungsrohres mit einem langen Durchgangsweg (baffle chamber combustion tube), das auf eine Temperatur von etwa 1000° und mehr erhitzt wird, ist es *Ingram* und *Belcher*[10] gelungen, die Verbrennungskapazität des Ofens derart zu steigern, daß das Verbrennen einer Mikroeinwaage bei einem Sauerstoffstrom von 50 ml/min im Laufe von 5 Minuten beendet werden kann. Denselben Effekt haben wir mit einer 3,5 cm langen Schicht des $AgMnO_2$-Katalysators, die in einem Supremaxverbrennungsrohr auf 450 bis 550° erhitzt wurde, bei einem

Sauerstoffstrom von 8 ml/min erzielt[14]. Bei der gleichen Einrichtung und einem Sauerstoffstrom von etwa 15 ml/min dauert das Verbrennen einer Halbmikroeinwaage (15 mg) 5 bis 15 Minuten*[12,13]. Der Katalysator absorbiert Schwefeldioxyd unter Bildung von Silber- und Mangansulfat und Halogene, die in Silberhalogenid übergehen[11,13]. Fluor wird durch die kurze Füllung nicht quantitativ aufgefangen[13]. Gute Resultate wurden in diesem Falle an der längeren Füllung[12] erzielt.

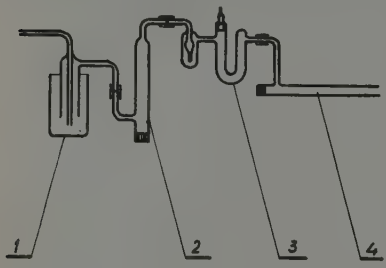

Abb. 1. *Pregl*sche Druckregelungs- und Reinigungsvorrichtung
1 Druckregler, *2* Calciumchloridturm, *3* U-Röhrchen mit Blasenzähler, *4* Verbrennungsrohr

Apparatur

Regulier- und Reinigungsvorrichtung

Der Sauerstoff wird einer Stahlflasche mittels eines Reduzierventils entnommen. Im übrigen wird die Einrichtung nach *Pregl*[25] (Abb. 1) verwendet, die aus dem Druckregler, Calciumchloridtrockenturm und U-Röhrchen mit dem Blasenzähler (gefüllt mit Natronasbest, Anhydrone und Chrom-

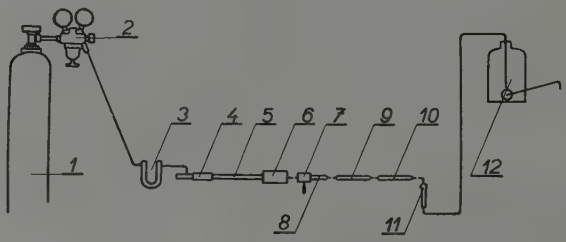

Abb. 2. Gesamtbild der Apparatur
1 Stahlflasche mit Sauerstoff, *2* Reduzierventil, *3* U-Rohr mit Anhydrone und Natronasbest, *4* Messingrohr, *5* Verbrennungsrohr, *6* Elektrischer Ofen, *7* Elektrischer Heizkörper, *8* Wasserabsorptionsapparat, *9* Stickstoffdioxydabsorptionsrohr, *10* Kohlendioxydabsorptionsapparat, *11* Calciumchloridröhrchen, *12* Mariottesche Flasche

Schwefelsäure, besser als mit Natronlauge) besteht. Nach Belieben kann man allerdings auch verschiedene Typen von Strömungsmessern verwenden oder, wie wir an der Analyse der siliziumorganischen Verbindungen gezeigt haben[15], die weitere Regulierung des Sauerstoffstromes überhaupt unterlassen und das Reduzierventil der

* Im Falle der *Ingrams*chen Methode 20 Minuten[31], bzw. muß der Sauerstoffstrom bis auf 150 ml/min gesteigert werden[32].

Stahlflasche mittels eines einfachen, mit Natronasbest und Anhydrone gefüllten U-Rohres unmittelbar mit dem Verbrennungsrohr verbinden (Abb. 2). Im Falle der Mikrobestimmung[14] ist die Vorverbrennung etwaiger verbrennbarer Sauerstoffverunreinigungen unentbehrlich. Die Füllung des Vorverbrennungsrohres besteht gleichfalls aus einer 3,5 cm langen, auf 450 bis 550° erhitzten $AgMnO_2$-Schicht.

Verbrennungsrohr[13] (Abb. 3)

Es wurde ein 25 cm langes Supremaxrohr von 10 mm äußerem Durchmesser mit einem 4 cm langen, verjüngten Schnabel und einem 5 cm von der Rohrmündung angeschmolzenen, seitlichen Sauerstoffzuleitungs-

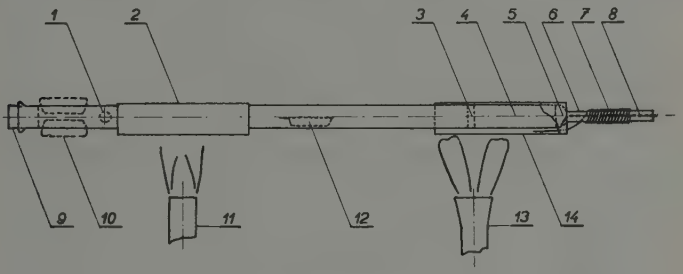

Abb. 3. Verbrennungsrohr

1 Seitliche Sauerstoffzuleitung, *2* Messingrohr, *3* Asbestschicht, *4* Schicht des Zersetzungsproduktes von Silberpermanganat, *5* Asbest, *6* Rohrschnabel, *7* und *8* Silberdraht, *9* Gummistopfen, *10* Stativgabel, *11* Brenner, *12* Platinschiffchen, *13* Mikrobrenner, *14* Deckmantel der Kontaktfüllung (Messingrohr)

röhrchen verwendet. In den Schnabel wird zur Wärmeübertragung ein Silberdraht von 1 mm Durchmesser gebracht, der am inneren Ende gebogen wird, um nicht herausfallen zu können. Dann folgt ein etwa 2 mm dicker Pfropf aus geglühtem Asbest und eine 3,5 cm lange Schicht des $AgMnO_2$-Katalysators, die wieder von Asbest und einem kleinen Silberwollebausch festgehalten wird. Bei Verwendung eines *Pregl*schen Druckreglers muß diese Asbestschicht hinreichend fest zusammengedrückt werden, damit die Strömungsgeschwindigkeit bei der Betriebstemperatur (450 bis 550°) und bei einem Sauerstoffüberdruck von 5 bis 10 cm Wassersäule für die Semimikrobestimmung 15 ml/min, für die Mikrobestimmung 8 ml/min beträgt.

Verbrennungsvorrichtung (Abb. 3)

Das Verbrennungsrohr kann im Notfalle mittels eines Laboratoriumstativs festgehalten werden. Zum indirekten Erhitzen der Substanz mit Hilfe eines Gasbrenners schiebt man ein 6,5 cm langes Stück Messing-

rohr von 14 mm Durchmesser und etwa 0,3 mm Wandstärke über das Verbrennungsrohr. Das Verbrennen mittels eines Gasbrenners halten wir wegen der Möglichkeit schneller Regulierung für vorteilhafter als die Verwendung eines beweglichen elektrischen Ofens. Zum Erhitzen der Katalysatorschicht dient ein geeigneter elektrischer Ofen, bzw. wird ein zweites Messingrohr gleicher Dimensionen als Schutzmantel für die Katalysatorschicht verwendet und mit einem zweiflammigen Mikrobrenner erhitzt. Der Schutzmantel soll in der Richtung zum beweglichen Brenner etwa 1,5 cm über die Katalysatorschicht hinausragen. Der zweiflammige Mikrobrenner wird z. B. aus einem Teclu-Brenner in der Weise hergestellt, daß seine ursprünglich kreisförmige Öffnung durch Zusammendrücken zu zwei ovalen Öffnungen umgeformt wird. Der Brenner wird so gestellt, daß eine seiner Flammen das Eintrittsende des Messingrohres und die zweite Flamme den mittleren Teil des Messingrohres erhitzt. Dadurch wird ein passendes Temperaturgefälle erreicht und die Abscheidung von Zersetzungsprodukten der Analysensubstanz vor dem Eintritt in die Kontaktzone verhindert. Die Flammenhöhe wird so eingestellt, daß die Innentemperatur des Verbrennungsrohres etwa 450 bis 500° beträgt. (Es genügt, die Temperatur ein für allemal zu messen.)

Um die Wasserkondensation im Verbrennungsrohrschnabel während der Analyse zu verhindern, wird der mittlere Schnabelteil in der Länge von 2 cm mit einem Kupfer- oder besser mit einem Silberdraht von 1 mm Durchmesser umwickelt und ein Ende dieses Drahtes unter den Messingschutzmantel eingeschoben (Abb. 3, 7).

Absorptionsvorrichtung

Für die Mikrobestimmung sind z. B. die *Pregl*schen Mikroabsorptionsapparate[25] geeignet. Bei der Semimikrobestimmung verwenden wir offene Absorptionsapparate[26] (Abb. 4) mit weiteren Kapillaren als bei den *Pregl*schen Apparaten; zur Verhinderung des Gasaustausches werden sie vor und nach der Analyse in spezielle Federgabeln[26] (Abb. 5) eingeklemmt. Die Wägung erfolgt allerdings offen.

Der *Wasserabsorptionsapparat* (Abb. 4 *b*). In ein einseitig zugeschmolzenes, dünnwandiges Glasröhrchen von 10 mm Durchmesser mit einem Zuleitungsröhrchen vom Durchmesser des Verbrennungsrohrschnabels und mit einer kapillaren Verjüngung von 0,2 bis 0,6 mm lichter Weite (Abb. 4 *a*) bringt man einen kleinen Wattebausch und füllt eine etwa 6 cm lange Anhydroneschicht ein. Diese wird wiederum mit Watte befestigt. Nun wird auch das andere Ende des Röhrchens zugeschmolzen. Dies läßt sich in einer Entfernung von etwa 1,5 bis 2 cm vom Wattebausch sicher durchführen. Vor Gebrauch werden die zugeschmolzenen Enden etwa 1 cm vor der Kapillarverjüngung abgeschnitten und rundgeschmol-

zen. Bei der Absorption der Stickoxyde außerhalb des Verbrennungsrohres (s. unten) wird der erste Wattebausch weggelassen, da Stickstoffdioxyd an feuchter Watte in erhöhtem Maße absorbiert wird[27]. Bei dieser Arbeitsweise muß man während der ersten Analyse gewisse Vorsicht

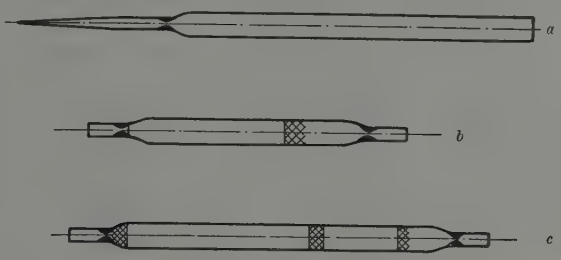

Abb. 4. Absorptionsapparate
a Einseitig zugeschmolzenes Röhrchen, *b* Wasserabsorptionsapparat, *c* Kohlendioxydabsorptionsapparat

walten lassen, um nicht winzige Anhydroneteilchen aus dem Absorptionsgefäß zu verschütten. Bei weiteren Analysen droht diese Gefahr nicht mehr.

Der *Kohlendioxydabsorptionsapparat* (Abb. 4 *c*). Man verwendet ein Röhrchen gleicher Größe, das mit einer Schicht von Natronasbest (7 cm) und Anhydrone (3 cm) gefüllt wird. Die Füllung wird an beiden Enden durch kleine Wattebausche fixiert. Zwischen die Natronasbest- und Anhydroneschicht wird ein größerer Wattebausch eingelegt. Im übrigen verfährt man ebenso wie beim Wasserabsorptionsapparat.

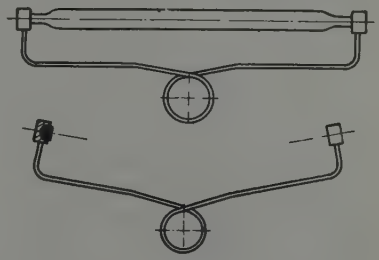

Abb. 5. Federgabel

Der gefüllte Wasserabsorptionsapparat wiegt 8 bis 9 g, der Kohlendioxydabsorptionsapparat 10 bis 11 g. Die Apparate lassen sich leicht reinigen und die Bruchgefahr während der Manipulation ist sehr gering. Sie können auf Vorrat hergestellt und zugeschmolzen aufbewahrt werden. Wenn die Füllung erschöpft ist, werden die Apparate weggeworfen. Das Anhydrone kann regeneriert werden.

Die *Federgabel* (Abb. 5) wird aus Stahldraht von 2 mm Durchmesser hergestellt. An ihren beiden Enden befinden sich eingeschraubte Messingkappen von 10 mm Durchmesser und 7 mm Höhe, die mit einer Weichgummieinlage versehen sind.

Der *elektrische Heizkörper*[12] (Abb. 6) (8 V, 28 Ω) von 3 cm Länge und 11 mm innerem Durchmesser verhindert die Wasserkondensation in den Eintrittstellen des Wasserabsorptionsapparates und unterdrückt die Stickstoffdioxydabsorption an den feuchten Teilen der Anhydroneschicht. Er wird über einen Klingeltransformator vom Stromnetz gespeist.

Beseitigung der Stickoxyde. Zur Stickstoffdioxydabsorption außerhalb des Verbrennungsrohres* wird ein Absorptionsapparat gleicher Konstruktion wie für Kohlendioxyd und Wasser verwendet[12] (Abb. 4). Dieser wird mit Anhydrone (2 cm), dann mit feuchtem Zersetzungsprodukt des Silberpermanganates (16 bis 20 cm, 5 g des ungeglühten Produktes mit 1 ml Wasser vermischt) und wieder mit Anhydrone (5 bis 7 cm) gefüllt. Diese Füllung reicht für 30 bis 40 Semimikroanalysen aus. Zwischen den einzelnen Verbrennungen wird dieses Röhrchen durch kleine Gummischläuche mit eingesteckten kurzen Glasstäbchen verschlossen gehalten.

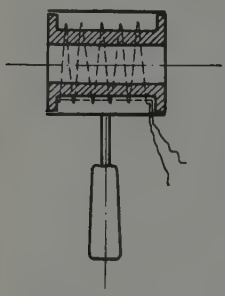

Abb. 6. Heizkörper (s. Abb. 2, 7)

Neuerdings haben wir für die äußere Stickstoffdioxydabsorption zuerst bei der Mikrobestimmung[14] und jetzt auch bei der Halbmikrobestimmung vorzugsweise Mangandioxyd-Kieselsäure (in einer 7 cm langen Schicht) eingeführt. Das Absorptionsrohr ist dem Kohlendioxydabsorptionsapparat (Abb. 4 *c*) gleich, nur die Natronasbestschicht ist durch dieses Reagens ersetzt.

Darstellung der Mangandioxyd-Kieselsäure

240 ml Wasserglas (entsprechend 16 g NaOH, durch Titration gegen Methylorange ermittelt) werden mit dest. Wasser auf 2 l verdünnt, mit einer Lösung von 31,5 g Kaliumpermanganat in etwa 200 ml Wasser gemischt und mit 60 g $MnCl_2 \cdot 4\,H_2O$ (bzw. mit entsprechenden Mengen Nitrat oder Sulfat) in 1 l Wasser unter kräftigem Rühren versetzt. Der entstandene voluminöse, von Kieselsäure durchdrungene Mangandioxydniederschlag wird durch Dekantieren zuerst mit Wasser, dann mit verd. Salpetersäure (1 : 10) und wieder mit Wasser durchgewaschen, abgesaugt und bei 150° getrocknet. Nach dem Zerkleinern wird das Präparat gesiebt und die Portion, die zwischen dem Sieb Nr. 6 und Nr. 40 (DIN) zurückbleibt, über Nacht im Exsiccator in einer dünnen Schicht über Wasser stehengelassen und zur Füllung der Absorptionsrohre verwendet.

Nach unserer Erfahrung ist das feuchte Mangandioxyd-Kieselsäure-Reagens dem Mangandioxyd nach *Belcher* und *Ingram*[27] überlegen. Die

* Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, die Stickoxyde unmittelbar im Verbrennungsrohr mit einer Bleidioxydschicht bei 180 bis 200° aufzufangen. Die Nachteile einer Bleidioxydverwendung wurden jedoch in der Literatur mehrmals diskutiert.

Chemisorption des Stickstoffdioxydes verläuft in Gegenwart von Kieselsäure viel besser als ohne diese. Das frische Reagens wird durch Einwirkung von Stickstoffdioxyd in scharf begrenzter Zone rein weiß.

Die Absorptionsvorrichtung wird durch ein *Calciumchloridröhrchen* vor Feuchtigkeitsaufnahme geschützt[25] (Abb. 2, *11*).

Die *Mariottesch Flasche*[25] (Abb. 2, *12*) verwenden wir zur Mikrobestimmung; bei der Semimikrobestimmung nur, wenn ohne Druckregler[15] (Abb. 2) gearbeitet wird, um die Strömungsgeschwindigkeit zu kontrollieren. Bei Verwendung der *Preglsch*en Reinigungsvorrichtung (Abb. 1) genügt es, den Blasenzähler ein für allemal zu eichen und die Mariottesche Flasche wegzulassen. Anstatt dieser kann im Falle verminderter Durchlässigkeit der Absorptionsvorrichtung mittels einer Wasserstrahlpumpe vorsichtig gesaugt werden[13].

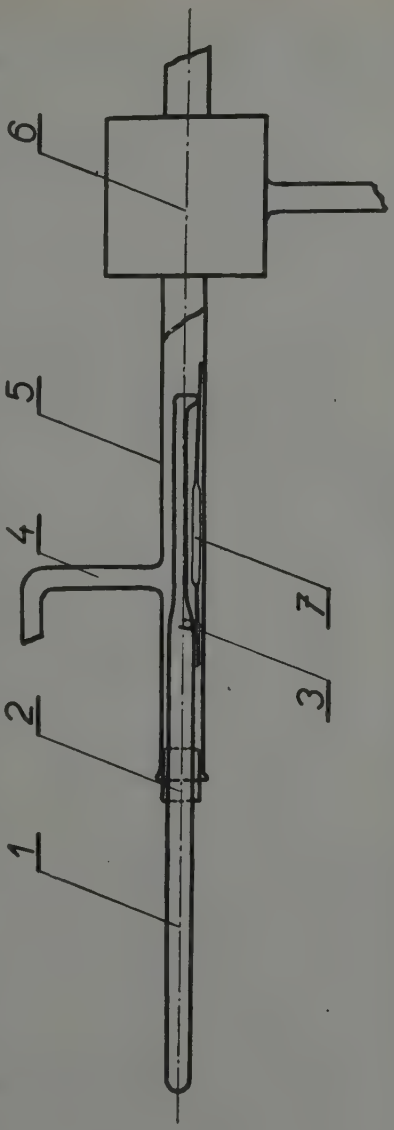

Abb. 7. Vorrichtung zum Zerbrechen der Substanzkapillare
1 Supremaxglasstab, *2* Gummistopfen, *3* Platindrahtschlinge, *4* Seitliches Zuleitungsrohr, *5* Verbrennungsrohr, *6* Kühltrog, *7* Kapillare mit der Einwaage

Zusatzvorrichtungen

Einige Zusatzvorrichtungen wurden bei der Ausarbeitung einer Semimikromethode zur Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung in siliziumorganischen Verbindungen vorgeschlagen[15]. Die Verbrennungsweise der leichtflüchtigen silizium-organischen Ver-

bindungen kann ohne weiteres auf leichtflüchtige, rein organische Stoffe übertragen werden. Solche Substanzen werden in eine übliche Glaskapillare[25], eventuell unter Zuhilfenahme von Trockeneis eingeschmolzen und gewogen. Das Öffnen dieser Kapillare wird jedoch vorzugsweise erst im Inneren des Verbrennungsrohres mit Hilfe einer einfachen Vorrichtung durchgeführt[15] (Abb. 7). Diese besteht aus einem 6 mm dicken Supremaxglasstab, der durch den Gummistopfen an der Mündung des Verbrennungsrohres gesteckt, im Inneren des Rohres in einer Entfernung von etwa 4 bis 5 cm hinter dem Stopfen auf 3 bis 4 mm verjüngt und am Ende (9 cm von dem Stopfen) hakenartig gebogen ist. An der Stelle der Verjüngung wird eine Platindrahtschlinge eingeschmolzen, die zur Befestigung der Einwägekapillare dient. Der fein ausgezogene Teil dieser Kapillare muß dabei über das hakenartige Ende des Glasstabes hinausragen. Die zwar beschränkte Beweglichkeit dieser Vorrichtung genügt, um das zugeschmolzene Ende der Kapillare zu zerbrechen. Man drückt dazu den herausragenden Teil des Supremaxglasstabes mäßig nach oben.

Kühltrog[15] (Abb. 7, *6*). Um bei solchen leichtflüchtigen Stoffen die Bildung eines explosiven Gemisches mit Sauerstoff, das recht gefährlich sein kann, zu vermeiden, wird in die Mitte zwischen den erwähnten Glasstab und den Heizofen ein Kühltrog aus Eisenblech (4 × 4 × 4 cm) angebracht, den man mit Trockeneis füllt. Die nach dem Öffnen der Kapillare spontan oder durch gelindes Erwärmen verdampfende Substanz kondensiert an der gekühlten Stelle des Verbrennungsrohres in Form eines Tropfens. Legt man an diese Stelle vorher ein kleines Stück Asbest, so wird es von der Flüssigkeit durchtränkt. Durch langsames Verschieben des Troges nach rückwärts wird nun die Substanz allmählich und ohne Explosionsgefahr zum Verdampfen und Verbrennen gebracht. Ohne Asbestbausch (oder ein anderes geeignetes poröses Material) würde sich der kondensierte Flüssigkeitstropfen unabhängig vom Sauerstoffstrom in der Richtung des Kühltroges bewegen und immer an der kühlsten Stelle des Verbrennungsrohres stehenbleiben, wodurch die zweckmäßige Verdampfung der Substanz gestört würde.

Die Explosionsgefahr kann noch weiter durch Einlegen eines Silberwollebausches an der Grenze der warmen und der kalten Zone des Verbrennungsrohres *(Antidetonationspfropfen*[15]*)* und durch lockeres Ausfüllen des Raumes zwischen diesem Silberbausch und der Katalysatorschicht mit Asbest erniedrigt werden.

Da das Messingrohr, das normalerweise zum Erhitzen der Substanz verwendet wird, das Verschieben des Kühltroges hindern könnte, wird es durch ein leicht abnehmbares *C-förmiges Messingblech*[15] ersetzt.

Sehr stark feuchtigkeitsempfindliche Flüssigkeiten (z. B. gewisse Chlorsilane) werden in einem mit trockenem Kohlendioxyd bzw. Stick-

stoff oder Sauerstoff gespeisten, mit Öffnungen für die Hände versehenen *Schrank*[15] in die Kapillaren gefüllt. An Stelle des Mikrobrenners wird dabei eine elektrische Heizspirale verwendet (bzw. auch Trockeneis). Das Zuschmelzen der Kapillaren wird außerhalb des Kastens durchgeführt.

Durchführung der Verbrennung

Zu der eigentlichen Methodik bleibt nach dem Gesagten nur wenig hinzuzufügen. Nach dem Zusammenstellen der Apparatur wird das Verbrennungsrohr etwa 20 Minuten im Sauerstoffstrom geglüht. Beim Halbmikroverfahren werden rund 15 mg Substanz je nach deren Eigenschaften entweder in ein Platinschiffchen oder in eine Kapillare eingewogen. Die Verbrennung wird in der üblichen Weise bei einem Sauerstoffstrom von zirka 15 ml/min im Laufe von 5 bis 10 Minuten durchgeführt[13]. Für leichtflüchtige Verbindungen benützt man die Vorrichtung zum Zerbrechen der Kapillare[15] und das oben beschriebene Verbrennungsverfahren unter Verwendung von Trockeneis. Für silizium-organische Verbindungen empfiehlt es sich, die Temperatur des Katalysators bis auf 600° zu steigern und den Verbrennungsprozeß etwas langsamer zu führen (30 Minuten)[15]. Nach dem Verbrennen der Substanz wird das Rohr kurz durchgeglüht und mit 150 ml Sauerstoff gespült, der entweder mit der Mariotteschen Flasche oder bei eingestellter Sauerstoffgeschwindigkeit nach der Zeit gemessen wird. Die Analyse wird in der gewöhnlichen Weise beendet.

Bei dem Mikroverfahren[14] (Einwaage etwa 4 mg) setzt man den Sauerstoffstrom auf 8 ml/min herab, verbrennt die Substanz im Laufe von 5 Minuten und verwendet zum Nachspülen 80 bis 120 ml Sauerstoff, so daß die Gesamtmenge Sauerstoff 150 ml beträgt. Besondere Beachtung ist in diesem Falle der Pflege der Absorptionsapparate und ihrer Wägung zu schenken.

Die Absorptionsapparate werden nach dem Entfernen von der Apparatur zuerst mittels eines feuchten Flanellappens und dann nacheinander mit zwei Hirschlederlappen abgewischt. In den nach dem Abwischen des Wasserabsorptionsapparates folgenden 6 Minuten wird der Nullpunkt der Waage ermittelt. In der 6. Minute wird der Wasserabsorptionsapparat in die Waage eingehängt und in der 10. Minute sein Gewicht abgelesen. In der 11. Minute wird der Kohlendioxydabsorptionsapparat in die Waage gelegt und sein Gewicht in der 15. Minute festgestellt. In gleicher Weise wird vor der Analyse verfahren.

Schlußbemerkungen

In einer Reihe von Laboratorien werden nunmehr jährlich, soweit uns bekannt ist, weit über 2000 Routine-Analysen auf die beschriebene

Weise, besonders im Halbmikromaßstabe, durchgeführt. Einige Beispiele wurden in den früheren Veröffentlichungen[12–15] publiziert. Die erzielten Ergebnisse liegen stets innerhalb der Toleranzgrenzen von $\pm$ 0,30% für die beiden Elemente.

Die Hauptvorteile der Verwendung des neuen Katalysators lassen sich in einigen Punkten zusammenfassen:

1. Die Herstellung des Silberpermanganates konstanter Reinheit sowie die Herstellung des Zersetzungsproduktes ist sehr einfach.

2. Die Schnelligkeit der Verbrennung ist jener der sogenannten „Schnellmethoden" gleich, ohne daß der Sauerstoffstrom bis auf 50 ml/min gesteigert werden muß.

3. Die Verwendung der kurzen Füllung des Verbrennungsrohres und des kurzen Stickstoffdioxydabsorptionsrohres führt zu einer weitgehenden Verminderung des toten Raumes der Apparatur und damit zu einer erhöhten Genauigkeit der Ergebnisse.

4. Mit Rücksicht auf die niedrige Verbrennungstemperatur können gewöhnliche Hartglasrohre an Stelle der teuren Quarzrohre verwendet werden.

5. Das Füllen des Verbrennungsrohres ist im Laufe einiger Minuten durchführbar. Nach einem ganz kurzen Ausglühen ist die Apparatur zur Analyse bereit; daher eignet sich die beschriebene Methode auch für solche Laboratorien, die Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmungen nur von Zeit zu Zeit durchzuführen haben.

Möglichkeit der Schwefelbestimmung[16]

Wie bereits erwähnt, wird unter den Bedingungen der Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung durch die Einwirkung des Schwefeldioxyds auf das Zersetzungsprodukt des Silberpermanganates ein Gemisch vom Silber- und Mangan(II)sulfat gebildet. Diese können aus der Masse durch warmes Wasser ausgelaugt werden. Da die Bestimmung als Sulfat wegen der damit verbundenen langwierigen Arbeit kaum in Frage kommt, wurde ein anderer Weg gesucht.

Bei Abwesenheit anderer Anionen kann man erwarten, daß die Menge der in Lösung gehenden Silber- und Mangan(II)ionen in stöchiometrischem Verhältnis zur Menge der Sulfationen stehen würde. Mangan(II)ion läßt sich sehr genau und einfach gegen Eriochromschwarz T komplexometrisch bestimmen[28], für Silber gilt dies leider nicht. Es war deshalb unser Bestreben, das Silberion gegen äquivalente Mengen Mangan in der Lösung auszutauschen. Dies kann durch Zusatz von Mangandioxyd und Wasserstoffperoxyd nach der Gleichung

$$2\,Ag^{+} + MnO_2 + 2\,H_2O_2 = 2\,Ag + Mn^{2+} + 2\,H_2O + 2\,O_2 \qquad (1)$$

erfolgen.

Gewisse Schwierigkeiten waren vorauszusehen, andere zeigten sich im Laufe der Arbeit. Das Wasserstoffperoxyd muß vollkommen säurefrei sein, um die Reaktion

$$MnO_2 + 2\,H^+ + H_2O_2 = Mn^{2+} + 2\,H_2O + O_2, \qquad (2)$$

die zu einem höheren Mangangehalt der Lösung führen würde, ausschließen zu können. Deshalb wurde Harnstoffperoxydhydrat[29] an Stelle von Wasserstoffperoxyd verwendet. Es stellte sich jedoch heraus, daß die oben erwähnte Reaktion (2) in beträchtlichem Ausmaße sogar mit Kohlendioxyd verläuft. Das Kohlendioxyd enthaltende Wasser reagiert überdies mit dem Zersetzungsprodukt des Silberpermanganates nach der Gleichung:

$$2\,AgMnO_2 + 4\,H^+ = 2\,Ag^+ + MnO_2 + Mn^{2+} + 2\,H_2O \qquad (3)$$

Daher muß mit kohlendioxydfreiem Wasser gearbeitet werden.

Versuche, die durch Verbrennen reinen Schwefels (4 bis 22 mg) durchgeführt wurden[16], zeigten gute Übereinstimmung mit der Theorie. Für die Semimikro- und Mikrobestimmung des Schwefels in organischen Stoffen ist es jedoch erforderlich, die Methode weiter zu verfeinern, woran derzeit gearbeitet wird.

Nachweis von Elementen in organischen Stoffen[17]

Eine Reihe von Methoden wurde für den Nachweis von Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Schwefel, Halogenen und anderen Elementen in organischen Stoffen vorgeschlagen. Manche davon, wie z. B. das Erhitzen der Substanz mit Kupferoxyd zum Kohlenstoff- und Wasserstoffnachweis, *Lassaigne*- und *Beilstein*-Reaktion usw., sind allgemein bekannt. Ein neuer, sehr einfacher, schneller und bequemer Weg zum Nachweis von C, H, N, Cl, Br, J, P, As und Hg, der bei einem Substanzverbrauch von 0,1 bis 1 mg sowohl eine systematische als auch eine spezifische Untersuchung der Substanz erlaubt, ergab sich durch die Ausnutzung der Oxydations- und Absorptionseigenschaften des thermischen Zersetzungsproduktes von Silberpermanganat. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Methoden der Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Schwefelbestimmung wird das Zersetzungsprodukt in diesem Falle vorher nicht geglüht. Das Erhitzen der Substanz mit solchem, viel schwach gebundenen Sauerstoff enthaltendem Zersetzungsprodukt hat schon bei mäßig erhöhter Temperatur die oxydative Zerstörung der Substanz zur Folge, die sich in der Regel durch Aufglühen der Reaktionsmischung bemerkbar macht. Kohlenstoff und Wasserstoff werden dabei zu Kohlendioxyd und Wasser verbrannt, Quecksilber in elementarer Form freigesetzt, Schwefel wird im Reaktionsgemisch als Silber- und Mangan(II)-

sulfat, die Halogene als Silberhalogenide und ein Teil des Stickstoffs als Silbernitrat gebunden. Phosphor und Arsen werden als Phosphat bzw. Arseniat zurückgehalten. Die gebildeten Silbersalze der gesuchten Elemente der organischen Substanz unterscheiden sich voneinander durch ihre verschiedene Löslichkeit in Wasser, Ammoniak usw. Sie lassen sich also aus dem Reaktionsgemisch in geeigneter Weise nacheinander auslaugen und mittels empfindlicher Reaktionen der qualitativen Analyse nachweisen.

Abb. 8. Zersetzungs- und Filtrierröhrchen *a* leer, *b* gefüllt, *c* beim Auswaschen

Apparatur

Das Zersetzungs- und Filtrierröhrchen (Abb. 8*a*) ist 13 cm lang und von 4 mm lichter Weite. Ungefähr 9 cm vom oberen Rand ist es auf etwa 0,3 mm verjüngt und der kürzere Teil zu einer Pipette ausgezogen. Zum Arsennachweis wird die Apparatur nach *Vašák* und *Sedivec*[30] verwendet.

Verfahren

In das Zersetzungsröhrchen wird ein kleiner ausgeglühter Asbestbausch eingelegt und mit dem Stiel eines Metallspatels mäßig zusammengedrückt. Die Mischung der zu untersuchenden Substanz (0,1 bis 1 mg) mit etwa 50 mg des Zersetzungsproduktes von Silberpermanganat wird auf die entstandene Filtriereinlage aufgeschüttet und festgedrückt. Diese Schicht wird wiederum mit einem Asbestbausch fixiert (Abb. 8*b*). Flüssigkeiten werden mittels einer Kapillare auf die kurze Schicht des Zersetzungsproduktes gebracht und mit diesem überschichtet. Nach mäßigem Erhitzen mit einem Mikrobrenner ist die Zersetzung innerhalb einiger Sekunden beendet. Die einzelnen Elemente werden wie folgt nachgewiesen:

Wasserstoff macht sich durch Tröpfchenbildung an der kühlen Wand des Zersetzungsröhrchens bemerkbar.

Kohlenstoff. Nach der Reaktion verbleibt im Zersetzungsröhrchen eine zum verläßlichen Nachweis hinreichende Menge Kohlendioxyd. An das obere Ende des noch warmen Röhrchens wird ein Gummiball (z. B. von einer automatischen Bürette) angesetzt und der gasförmige Röhrcheninhalt dicht über den Flüssigkeitsspiegel einer klaren, frisch filtrierten, in einem Reagensglas (12 × 120 mm) befindlichen, gesättigten Bariumhydroxydlösung (etwa 1 ml) geblasen. Das Kohlendioxyd macht sich durch eine auf der Flüssigkeitsoberfläche gut sichtbare Trübung von Bariumcarbonat bemerkbar.

Stickstoff. Das bei der Oxydation stickstoffhaltiger Verbindungen in größeren oder kleineren Mengen gebildete Stickstoffdioxyd wird zum Teil im Zersetzungsprodukt aufgefangen, zum Teil in den Wassertröpfchen an der Röhrchenwand gelöst. In das ausgekühlte Röhrchen werden mit Hilfe einer Mikropipette einige Tropfen dest. Wasser eingetragen (Abb. 8*c*) und die Flüssigkeit mit Hilfe des Gummiballs in das verjüngte Ende gedrückt. Einen Tropfen davon bringt man auf einem Uhrglas zu 1 ml einer 1%igen Diphenylaminlösung in konz. Schwefelsäure. Die Anwesenheit von Stickstoff macht sich an der Berührungsfläche durch Blaufärbung bemerkbar, die besonders auf einer weißen Unterlage gut sichtbar ist.

Schwefel. Die restliche Flüssigkeit wird aus dem verjüngten Röhrchenende in ein Mikroreagensglas ausgedrückt. Falls sich nach dem Hinzufügen eines Tropfens einer 5%igen Bariumnitratlösung ein weißer Niederschlag von Bariumsulfat bildet, enthält die Verbindung Schwefel.

Chlor und *Brom.* Sodann wird das Röhrchen mit einigen Tropfen Ammoniak (1 : 1) beschickt und die Lösung ins Reagensglas ausgedrückt. Nach dem Ansäuern mit konz. Salpetersäure bildet sich eine charakteristische Trübung oder ein Niederschlag von Silberchlorid oder -bromid. Das Halogen wird mittels einer der bekannten Reaktionen identifiziert.

Phosphor und *Arsen.* Im Filtrat oder Zentrifugat des Silberhalogenidniederschlages weist man Phosphor oder Arsen mit Molybdatlösung nach. Arsen kann auch mit Hilfe der Methode nach *Vašák* und *Sedivec*[30] unmittelbar im Tropfen des ammoniakalischen Filtrates nachgewiesen werden.

Jod. Nach dem Auswaschen mit Ammoniak, das man im Falle der positiven Reaktion auf Chlor oder Brom bis zum Ausbleiben der Reaktion wiederholt, wäscht man den Rest im Röhrchen mit einigen Tropfen einer 30%igen Silbernitratlösung aus, worin sich Silberjodid gut löst. Nach Verdünnen des Filtrates mit Wasser trübt sich die Lösung zunächst durch das ausgeschiedene komplexe Silberjodid-Nitrat, nach weiterem Verdünnen fällt Silberjodid aus.

Quecksilber. Falls man in der Probe Quecksilber vermutet, muß der Zersetzungsvorgang ein wenig abgeändert werden. Das Röhrchen wird in der beschriebenen Weise gefüllt und mit Hilfe des Gummiballs wird schon während des Erhitzens der Verbindung ein mäßiger Luftstrom durchgeblasen. Zum Nachweis hinreichende Menge Quecksilber verflüchtigt sich in den verjüngten Röhrchenteil, wo dieses auch mit bloßem Auge sichtbar ist. Der sichere Nachweis wird in der Weise ausgeführt, daß man in die Spitze des Zersetzungsröhrchens ein wenig Dithizonlösung (1,3 mg in 100 ml CCl_4) einsaugt. Die eingesaugte Lösung darf dabei mit der Asbesteinlage nicht in Berührung kommen. Bei Gegenwart von Quecksilber beobachtet man einen Farbumschlag von Grün nach charakteristisch Orangegelb. Weil es sich um eine Reaktion des metallischen Quecksilbers mit Dithizon handelt, verläuft der Farbumschlag etwas

langsamer (etwa innerhalb 1 Minute). Durch Ausblasen und wiederholtes Einsaugen von wenig Wasser wird die Röhrchenspitze von der Dithizonlösung gereinigt, wobei wieder darauf zu achten ist, daß die Flüssigkeit mit der Filtriereinlage nicht in Berührung kommt. Die anderen Prüfungen, den Kohlenstoffnachweis ausgenommen, erfolgen in der bereits beschriebenen Weise. Falls gleichzeitig auch Kohlenstoff nachgewiesen werden soll, verbindet man die Röhrchenspitze mit Hilfe eines dünnen Gummischlauches mit einer passend gebogenen Kapillare, deren Ende in ein mit Bariumhydroxyd gefülltes Reagensglas eintaucht. Dann führt man unter gleichzeitigem Durchblasen von Luft die Zersetzung aus. Danach entfernt man die Kapillare und weist Quecksilber nach.

Schlußbemerkung

Die beschriebene Methode des qualitativen Nachweises der in organischen Stoffen am häufigsten vorkommenden Elemente kann als systematischer Analysengang angesehen werden. Sie erlaubt jedoch auch die rasche, von der Anwesenheit anderer Elemente weitgehend unabhängige Prüfung auf ein bestimmtes Element, was für die Praxis allerdings von größerer Wichtigkeit ist.

Die Anwendungsmöglichkeiten des Zersetzungsproduktes von Silberpermanganat für die Analyse sind mit diesen Angaben nicht völlig erschöpft. Es ergeben sich neue Probleme, z. B. die Halogen-, Arsen- und Phosphormikrobestimmung (etwa auf der Grundlage der oben beschriebenen Nachweisverfahren) u. a. An diesen Problemen sowie an einigen weiteren aus dem Gebiet der Gasanalyse wird derzeit gearbeitet.

Zusammenfassung

Es wurde über die thermische Zersetzung des Silberpermanganates sowie über die Verwertung seines Zersetzungsproduktes für die organische Analyse berichtet. Die Methode der Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung unter Verwendung einer kurzen $AgMnO_2$-Füllung des Verbrennungsrohres, unter Berücksichtigung leichtflüchtiger und siliziumorganischer Verbindungen und eine einfache Nachweismethode für C, H, N, Cl, Br, J, P, As und Hg in organischen Stoffen wurde beschrieben und die Möglichkeit der Schwefelbestimmung mit Hilfe dieses Zersetzungsproduktes diskutiert.

Summary

A report is given of the thermal decomposition of silver permanganate and the use of its decomposition products in organic analysis. Discussions are included of the determination of carbon and hydrogen with use of a short $AgMnO_2$ charging of the combustion tube, taking into account volatile and silicon-bearing organic compounds. A simple method of detecting

C, H, N, Cl, Br, I, P, As, and Hg in organic compounds is described and the possibility of determining sulfur with the aid of these decomposition products is discussed.

Résumé

Communication sur la décomposition thermique du permanganate d'argent et sur l'utilisation de son produit de décomposition en analyse organique. Description d'une méthode de dosage du carbone et de l'hydrogène dans un tube à combustion comportant un remplissage de faible longueur de $AgMnO_2$, avec considération particulière des combinaisons organiques très volatiles et contenant du silicium. Description d'une méthode simple d'identification de C, H, N, Cl, Br, I, P, As et Hg dans les substances organiques. Discussion de la possibilité de doser le soufre au moyen de ce produit de décomposition.

Literatur

[1] *M. Dennstedt* und *F. Hassler*, Z. analyt. Chem. **42**, 417 (1903).
[2] *H. Ter Meulen* und *J. Heslinga*, Neue Methoden der organisch-chemischen Analyse. Leipzig: Akademische Verlagsges. 1927.
[3] *H. Reihlen*, Mikrochem. **23**, 285 (1938).
[4] *G. Ingram*, J. Soc. Chem. Ind. **62**, 175 (1943).
[5] *P. N. Fedosejew* und *M. M. Pawlenko*, Shurnal Analititscheskoi Chimii **8**, 158 (1953).
[6] *I. Marek*, Bull. soc. chim. France (4) **43**, 910 (1928).
[7] *R. Belcher* und *C. E. Spooner*, J. Chem. Soc. London **1943**, 313.
[8] *G. Ingram*, Analyst **73**, 548 (1948).
[9] *R. Belcher* und *G. Ingram*, Analyt. Chim. Acta **4**, 118 (1950).
[10] *G. Ingram*, Chem. and Ind. **1956**, 103.
[11] *J. Körbl*, Coll. Czechoslov. Chemic. Commun. **20**, 948 (1955).
[12] *J. Körbl*, Coll. Czechoslov. Chemic. Commun. **20**, 953 (1955).
[13] *J. Körbl*, Coll. Czechoslov. Chemic. Commun. **20**, 1026 (1955).
[14] *J. Körbl* u. *K. Blabolil*, Coll. Czechoslov. Chemic. Commun. **21**, 318 (1956).
[15] *J. Körbl* und *R. Komers*, Chem. Listy **50**, 1120 (1956); Coll. Czechoslov. Chemic. Commun. (Im Druck).
[16] *J. Körbl* und *R. Přibil*, Coll. Czechoslov. Chemic. Commun. **21**, 322 (1956).
[17] *J. Körbl* und *R. Přibil*, Coll. Czechoslov. Chemic. Commun. **21**, 955 (1956).
[18] *V. Šatava* und *J. Körbl*, Chem. Listy. (Im Druck).
[19] *M. A. Gorgeu*, Bull. soc. chim. France **7**, 261 (1892).
[20] *A. Sieverts* und *H. Theberath*, Z. physik. Chem. **100**, 463 (1922).
[21] *F. Hein*, Z. anorg. Chem. **235**, 25 (1937).
[22] *G. A. Grant* und *M. Katz*, Canad. J. Chem. **32**, 1068 (1954).
[23] *G. M. Schwab*, Angew. Chem. **67**, 433 (1955).
[24] *D. A. Dowden*, Research **1**, 239 (1948).
[25] *F. Pregl*, Quantitative Organic Microanalysis, 4th Ed. London: Churchill. 1945.
[26] *J. Körbl*, Coll. Czechoslov. Chemic. Commun. **20**, 993 (1955).
[27] *R. Belcher* und *G. Ingram*, Analyt. Chim. Acta **4**, 401 (1950).
[28] *H. Flaschka* und *A. M. Amin*, Mikrochim. Acta [Wien] **1953**, 414.
[29] *S. Tanatar*, Shurnal Russkogo Fisiko-Chimitscheskogo Obschtschestwa **40**, 376 (1908).
[30] *V. Vašák* und *V. Šedivec*, Chem. Listy **46**, 341 (1952).
[31] *G. Ingram*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 877.
[32] *G. Ingram* und *M. Lonsdale*, Chem. and Ind. **1956**, 276.

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut und Pregl-Laboratorium der Universität Graz

Der Nachweis ungesättigter Fettsäuren am Papierchromatogramm

Von

J. Fries, A. Holasek und H. Lieb

Mit 1 Abbildung

(Eingelangt am 23. Juli 1956)

Die Papierchromatographie der Fettsäuren hat in der letzten Zeit, insbesondere durch Verwendung imprägnierter Papiere[1–4], gute Fortschritte gemacht. Vielfach fehlt es jedoch an ausreichend empfindlichen Methoden zur Sichtbarmachung kleinster Mengen höherer Fettsäuren. Im nachfolgenden wird eine Methode beschrieben, die noch einige Mikrogramm ungesättigter Fettsäuren am Papier nachzuweisen gestattet.

Das Verfahren beruht darauf, daß man die ungesättigten Säuren am Papierchromatogramm mit Ozon behandelt und die durch Hydrolyse entstandenen Aldehyde mit fuchsinschwefeliger Säure anfärbt. Es werden also Doppelbindungen nachgewiesen, so daß man nicht mehr von der Carboxylgruppe abhängig ist und daher auch Ester sichtbar machen kann.

Die nach einer der unten beschriebenen Methoden entwickelten Chromatogramme werden getrocknet und in einen Zylinder gehängt. Durch den Zylinder läßt man Ozon streichen. Je nach der entwickelten Ozonmenge beläßt man die Streifen 20 bis 60 Minuten in dieser Atmosphäre. Die Streifen werden dann mit dem Schiffschen Reagens besprüht, wobei nach einigen Minuten die Flecke erscheinen. Der Einfachheit halber verwendeten wir zur Darstellung des Reagens nicht schwefelige Säure, sondern ein Gemisch von Natriumhydrogensulfit und Salzsäure. Dabei wurde die Beobachtung gemacht, daß die rotvioletten Flecke um so langsamer erscheinen, je mehr Salzsäure man zusetzt. Am häufigsten wurde ein Gemisch folgender Zusammensetzung verwendet: Je 100 mg p-Rosanilin und Natriumhydrogensulfit löst man in 50 ml Wasser und

versetzt diese Lösung mit 1 ml konz. Salzsäure. Das Reagens ist nur begrenzt haltbar. Besprüht man mit diesem Reagens, so erscheinen die Flecke meistens innerhalb einer Minute.

Die Intensität der Anfärbung kann dadurch gesteigert werden, daß man die entwickelten Chromatogramme bereits vor der Ozoneinwirkung mit einer 1- bis 5%igen Lösung von Natriumhydrogensulfit besprüht. Dies dürfte darauf beruhen, daß das Sulfit die bei der Ozonisierung infolge der Luftfeuchtigkeit entstehenden flüchtigen Aldehyde fixiert. Oft gelingt noch eine weitere Steigerung der Farbintensität, wenn man die mit dem Reagens besprühten Chromatogramme nach etwa 30 Minuten mit einem Gemisch von konz. Hydrogensulfitlösung und konz. Salzsäure besprüht.

Bemerkenswert ist die Feststellung, daß die rotvioletten Flecke im Laufe von Stunden ihre Farbe ändern: Die der Ölsäure und anderen einfach ungesättigten Fettsäuren entsprechenden Flecke erscheinen blau; die Flecke der mehrfach ungesättigten Fettsäuren werden violett. Die Farbqualität scheint also von der Art der entstehenden Spaltprodukte abhängig zu sein. Diese Erscheinung wird zurzeit noch näher untersucht. Die angeführte Färbemethode kann ohneweiters angewendet werden, wenn das Papier nicht mit einer organischen Substanz imprägniert wurde, die die beschriebene Farbreaktion gibt.

Mit Hilfe dieser Art der Sichtbarmachung konnten wir auch zeigen, daß die Trennung der Ester der Öl-, Linol- und Linolensäure auf Papieren gelingt, wenn sie mit Paraffin imprägniert sind. Es kommt dabei anscheinend auch zu einer Trennung von Estern der gleichen Säure mit verschiedenen Alkoholen.

Im Rahmen dieser Veröffentlichung wird auf die verschiedenen Imprägnierungsmittel nicht näher eingegangen. Sehr gute Ergebnisse erzielt man bei Verwendung von Kohlenwasserstoffen als stabile Phase und einer damit gesättigten Essigsäure als bewegliche Phase, wie dies *Kaufmann* und *Nitsch* vorschlagen. Bei den abgebildeten Chromatogrammen wurde jedoch statt der von *Kaufmann* und *Nitsch* angegebenen Fraktion des Petroleums mit dem Siedepunkt von 190 bis 220° (oder „standardisiertes Undecan") flüssiges Paraffin (paraffinum liquidum) verwendet. Gegenüber der Petroleumfraktion hat es den Vorteil einer geringeren Flüchtigkeit, so daß man die gewünschte Menge viel einfacher auf das Papier bringen kann. Bei Verwendung der Petroleumfraktion muß man streng einzuhaltende Trocknungsvorschriften beachten oder das überschüssige Imprägnierungsmittel unter Kontrolle durch die Waage abtreiben[3]. Bei Paraffinimprägnierung genügt es, wenn man die Papiere in eine petrolätherische Lösung des Paraffins taucht und das Lösungsmittel abdampft. Erst eine länger dauernde Trocknung bei erhöhter Temperatur führt zum nachweisbaren Verdampfen des Paraffins. Aller-

dings können Unterschiede entstehen, wenn mehrmals in der petrolätherischen Lösung gebadet wird, da der Petroläther verdampft und die Lösung konzentrierter wird.

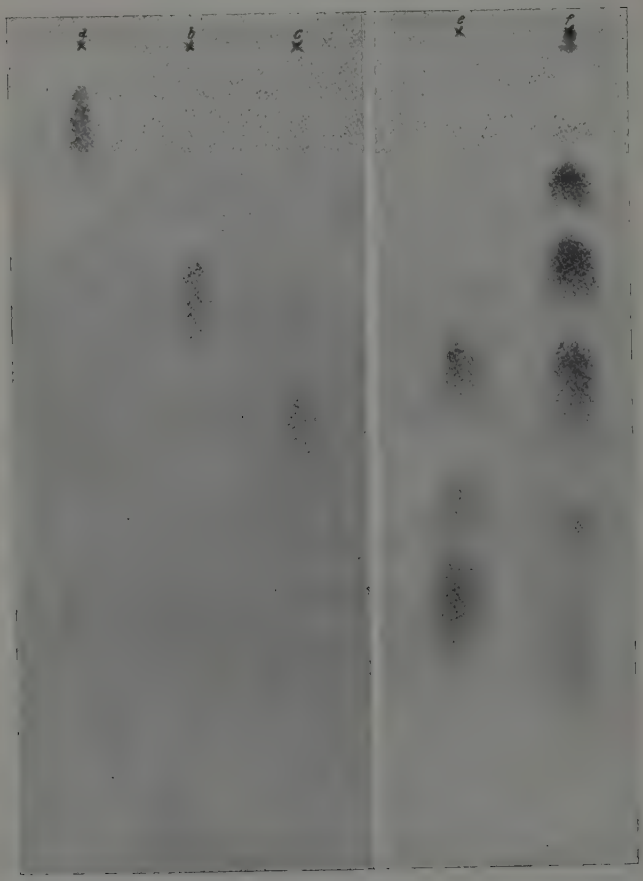

Abb. 1. Papierchromatogramme: a) Erucasäure, b) Ölsäure, c) Linolsäure (je 80 μg): e) Leinölsäuren, f) Lebertransäuren (insgesamt je 400 μg). Papier: Schleicher & Schüll 2043 b; stabile Phase: gereinigtes Paraffinöl; bewegliche Phase: mit Paraffinöl gesättigte, 90%ige Essigsäure

Ein weiterer Vorteil der Paraffinimprägnierung liegt in der Möglichkeit, durch Variation der auf das Papier gebrachten Paraffinmenge die R_f-

Werte zu beeinflussen. Diese Variation erreicht man durch Verwendung verschieden konz. Lösungen von Paraffin. Je größer die auf das Papier gebrachte Paraffinmenge ist, um so niedriger sind die R_f-Werte. Die abgebildeten Chromatogramme wurden auf Papieren entwickelt, die einmal durch eine 10%ige Lösung von Paraffin in Petroläther gezogen und getrocknet wurden.

Schließlich benötigt man bei den mit Paraffin imprägnierten Papieren bedeutend kürzere Laufzeiten als bei den mit einer Petroleumfraktion imprägnierten. Nach 14 Stunden absteigender Chromatographie ist die Front etwa 30 cm gewandert, wenn das Papier mit 10%igem Paraffin imprägniert war.

Gegenüber der Paraffinimprägnierung hat die Imprägnierung mit Petroleum den Vorteil, daß nach dem Ozonisieren geringere Mengen Fettsäuren noch deutlich sichtbar gemacht werden können. In dieser Beziehung verhält sich dieses Papier ähnlich wie unimprägniertes Papier, da Petroleum leicht abgedampft werden kann.

Weder die Petroleumfraktion, die bei 190 bis 220° übergeht, noch das käufliche Paraffinöl können ohne vorherige Reinigung verwendet werden, da sie nach der Ozonisierung und Besprühen mit dem Schiffschen Reagens einen farbigen Untergrund geben. Aus diesem Grunde sind beide wie folgt zu behandeln.

Man schüttelt die Kohlenwasserstoffe zweimal mit Pyroschwefelsäure (Oleum) und dann so lange mit konz. Schwefelsäure, bis sie hellgelb erscheinen. Nun schüttelt man mit 1- bis 3%iger Kaliumpermanganatlösung und dann wieder mit konz. Schwefelsäure, bis die Flüssigkeit farblos ist. Die Kohlenwasserstoffe werden darauf mit Natronlauge und schließlich mit Wasser gewaschen.

Das so vorbehandelte Paraffin verwendet man zur Imprägnierung in petrolätherischer Lösung und zur Sättigung der beweglichen Phase. Diese besteht bei den abgebildeten Chromatogrammen aus 90%iger Essigsäure. Zur Erzielung der Sättigung schüttelt man diese Essigsäure etwa 20 Minuten lang mit dem Paraffin und läßt absitzen.

Zusammenfassung

Die ungesättigten Fettsäuren eines papierchromatographisch getrennten Gemisches von Fettsäuren werden dadurch sichtbar gemacht, daß man das Chromatogramm mit Ozon behandelt und dann mit fuchsinschwefeliger Säure besprüht. Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgt auf Papieren, die mit flüssigem Paraffin imprägniert sind. Nach Beschreibung der Vorteile dieser Imprägnierungsart wird eine Anleitung zur Entfernung ungesättigter Verbindungen aus den Kohlenwasserstoffen gegeben.

Summary

The unsaturated fatty acids of a mixture of fatty acids that has been separated by paper chromatography is made visible by treating the chromatogram with ozone and then spraying with fuchsin-sulfurous acid. The development of the chromatogram is conducted on papers impregnated with liquid paraffin. After pointing out the advantages of this type of impregnation, directions are given for removing unsaturated compounds from the hydrocarbons.

Résumé

On révèle les acides gras non saturés d'un chromatogramme sur papier ayant servi à la séparation d'un mélange d'acides gras par traitement à l'ozone suivi d'une pulvérisation à l'aide d'acide sulfureux fuchsiné. Le développement du chromatogramme est effectué sur des papiers imprégnés de paraffine liquide. Après description des avantages qui résultent de ce mode d'imprégnation on indique un mode opératoire permettant d'éliminer les combinaisons non saturées des hydrocarbures.

Literatur

[1] *P. F. Ceccaldi, R. Wegmann* und *J. Bietz-Charreton*, Bull. soc. chim. biol. **36**, 415 (1954).

[2] *H. P. Kaufmann* und *W. H. Nitsch*, Fette und Seifen **56**, 154 (1954); **58**, 234 (1956).

[3] *H. Wagner, L. Abisch* und *K. Bernhard*, Helv. Chim. Acta **38**, 1536 (1955).

[4] *A. Holasek* und *K. Winsauer*, Mh. Chem. **85**, 796 (1954).

Mitteilungen aus chemischen Gesellschaften

The Society for Analytical Chemistry

Symposium on Microchemistry 1958

It is proposed to hold a Symposium on Microchemistry in 1958 under the auspices of the Society for Analytical Chemistry organised by the Midlands Section and the Microchemistry Group. The Symposium will be held in Birmingham over the period August 20—27th (inclusive). Further details will be announced at a later date.

Buchbesprechungen

H. Molisch: **Botanische Versuche und Beobachtungen ohne Apparate.** Ein Experimentierbuch für jeden Pflanzenfreund. 3., umgearb. und ergänzte Aufl. von *R. Biebl.* Mit 67 Abb., XI, 176 S. Stuttgart: Gustav Fischer. 1955. DM 12,40.

Das in der ersten Auflage von *Molisch* als ein „Experimentierbuch für jeden Pflanzenfreund" bezeichnete Buch hat mit der Mikrochemie heutiger Prägung vermeintlich keine unmittelbaren Beziehungen. Dennoch geht es mittelbar auch den modernen Mikrochemiker an, denn *Molisch* war nicht nur einer der Pioniere der angewandten Mikrochemie, sondern von ihm stammen grundlegende Erstbeobachtungen chemischer Reaktionen z. B. für Zucker, Anthocyane, Chlorophyll, kristallisierbare, gefärbte Eiweißstoffe (Phykocyan, Phykoerythrin u. a.), Eiweißkörper in Form „abnormer" Kristalle (nunmehr als pflanzliches Virus erkannt) u. v. a. *Molisch* war ein Virtuose des Experimentierens mit einfachsten Mitteln. Seine Beobachtungen betreffen vielfach jene Fragen, die Gegenstand der reinen und angewandten Chemie, vor allem der Biochemie sind, die ohne Mitwirkung der Mikrochemie den meisten ihrer Probleme hilflos gegenüberstünde. Blättert ein modern geschulter Mikrochemiker nachdenklich in diesem Experimentierbuch, so kann er sicher eine Fülle von Anregungen für eigene Arbeiten gewinnen, z. B. über natürliche Farbänderungen von Blütenfarbstoffen, die postmortale bzw. nekrobiotische Entstehung von Duft- und Farbstoffen, das Vergilben von Laubblättern in Abhängigkeit von Wärme, Wassergehalt, Sauerstoff usw.

Das Buch bedarf keiner wortreichen Empfehlung. Das Erscheinen der nunmehr 3., umgearbeiteten und ergänzten Auflage ist allein schon ein überzeugender Beweis dafür, daß es nach 25 Jahren an Interesse und Anziehungskraft nichts verloren hat. Die von *Biebl* besorgte neue Auflage hat

den Charakter des Buches in dankschuldiger Achtung für einen der bedeutendsten Botaniker feinfühlend bewahrt, obwohl im Vergleich zur ersten Auflage manche Änderungen in dem Sinn auffallen, daß einige Versuche bzw. rein deskriptive Beobachtungen weggelassen wurden, dafür aber vielerlei neue, einfache Experimente mit einfachsten Mitteln in Wort und Bild aufgenommen wurden.

Die Ausstattung des Buches und seine reichhaltige Illustration ist bemerkenswert. *J. Gicklhorn*-Wien

E. Schild: **Praktische Mikroskopie.** 3. neubearb. u. erweit. Aufl. Mit 122 Abb. im Text und auf XIX Bildtafeln, XII, 238 S. Wien-Bonn: Wilhelm Maudrich. 1955. Ganzl. DM 24,—, S 144,—.

Der als Privatgelehrter und als Forscher auf den verschiedensten Gebieten der mikroskopischen Forschung bekannte Verfasser, derzeit Leiter der von ihm begründeten Mikrobiologischen Station der Landeshauptstadt Linz, bringt in leichtverständlicher und flüssiger Sprache in dem nunmehr in 3. Auflage erschienenen Werke eine ausführliche Beschreibung der Mechanik und Optik des Mikroskops einschließlich des Aufbaues moderner Forschungsmikroskope, von denen das „Ortholux", das „Laborlux", das „Monokular-Mikroskop B" und das Kameramikroskop „Panphot" der Firma Leitz-Wetzlar, das große Forschungsmikroskop „Zetopan", das monokulare Laboratoriumsmikroskop „RC" und das Universal-Kamera-„Mikroskop MeF" der Firma Reichert, Wien, sowie das Mikroskop „SBI" und das Univarsal-Klein-Mikroskop „UKM" der Firma Merker, Wien, näher beschrieben werden. Im Kapitel über die gebräuchlichsten Hilfsapparate zum Mikroskop bringt er einen Überblick über Untersuchungen im polarisierten Licht, über das Messen mikroskopischer Präparate, über Blutkörperchenzählapparate, über Apparate zur Dunkelfeldbeleuchtung, über das „optische Färben" nach der von *Rheinberg* angegebenen Methode, über die Fluoreszenzmikroskopie, das Phasenkontrast- und Anoptralverfahren sowie über die Kolposkopie. Viele wertvolle, aus eigener praktischer Erfahrung stammende Hinweise enthält auch der ausführliche Abschnitt über Mikrophotographie und Mikrokinematographie, womit der allgemeine Teil abgeschlossen erscheint. Die nun folgenden Abschnitte bringen ausgewählte Kapitel aus der mikroskopischen Technik. Zunächst wird die Herstellung eines Nativpräparats und die „Küvetten-Mikroskopie" beschrieben, welch letztere Methodik der Beobachtung ganzer lebender Organismen in ihrer natürlichen Umgebung dient. Einen breiten Raum nimmt die histologische Technik einschließlich zahlreicher bewährter Färbemethoden ein. Die mikrobiologische Technik ist mit einzelnen Beispielen vertreten. Weitere Kapitel befassen sich mit der Mikroskopie des Harns, des Blutes, des Sputums, des Mageninhalts und der Faeces. Das Werk kann daher jedem an der mikroskopischen Forschung interessierten Laien bestens empfohlen werden. Es bietet aber auch dem Fachmann eine rasche Orientierungsmöglichkeit über alle Fragen, die das Mikroskop und seine Anwendungsgebiete betreffen. 52 mikrophotographische Aufnahmen des Verfassers zeigen besser als viele Worte die mannigfachen Anwendungsmöglichkeiten des Mikroskops und die vielfach wunderbaren Formen der Kleinlebewesen. *J. Michalka*-Wien

Herausgeber, Eigentümer und Verleger: Springer-Verlag in Wien, I., Mölkerbastei 5. — Für den Inhalt verantwortlich: Prof. Dr. *Michael Karl Zacherl*, Wien, XIX., Chimanistraße 21.
Druck: Manzsche Buchdruckerei, Wien, IX., Lustkandlgasse 52